

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**EFICÁCIA DA APLICAÇÃO DE OZÔNIO GASOSO EM CARCAÇAS
SUÍNAS NA ETAPA DE RESFRIAMENTO PARA O CONTROLE DE
BACTÉRIAS INDICADORAS E CAUSADORAS DE DOENÇAS
TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS**

GABRIELA OROSCO WERLANG

PORTO ALEGRE
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**EFICÁCIA DA APLICAÇÃO DE OZÔNIO GASOSO EM CARÇAÇAS
SUÍNAS NA ETAPA DE RESFRIAMENTO PARA O CONTROLE DE
BACTÉRIAS INDICADORAS E CAUSADORAS DE DOENÇAS
TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS**

Autora: Gabriela Orosco Werlang

**Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre
em Ciências Veterinárias, especialidade na
área de Bacteriologia Aplicada.**

**Orientadora: Dra. Marisa Ribeiro de
Itapema Cardoso**

PORTO ALEGRE

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Orosco Werlang, Gabriela
EFICÁCIA DA APLICAÇÃO DE OZÔNIO GASOSO EM CARÇAÇAS
SUÍNAS NA ETAPA DE RESFRIAMENTO PARA O CONTROLE DE
BACTÉRIAS INDICADORAS E CAUSADORAS DE DOENÇAS
TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS / Gabriela Orosco
Werlang. -- 2015.
64 f.

Orientadora: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Carcaça suína. 2. Ozônio. 3. Escherichia coli. 4.
Salmonella sp.. 5. Listeria sp.. I. Ribeiro de
Itapema Cardoso, Marisa, orient. II. Título.

Gabriela Orosco Werlang

EFICÁCIA DA APLICAÇÃO DE OZÔNIO GASOSO EM CARCAÇAS SUÍNAS NA ETAPA DE RESFRIAMENTO PARA O CONTROLE DE BACTÉRIAS INDICADORAS E CAUSADORAS DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2015

APROVADO POR

Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso
Orientadora e Presidente da Comissão

APROVADO POR

Dra. Marisa da Costa
Membro da Comissão

APROVADO POR

Dr. Luis Eduardo da Silva
Membro da Comissão

APROVADO POR

Dra. Marjo Cado Bessa
Membro da Comissão

*Dedico aos meus pais, Helenice e Jaime, e
minha irmã, Patricia, que sempre foram
meus melhores exemplos e incentivadores*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que me dá força e coragem para os desafios.

Aos meus pais e minha irmã que sempre entenderam as minhas escolhas e nelas me incentivaram e me ampararam em todos os momentos.

À Professora e Orientadora Marisa Cardoso pelos ensinamentos muito além do conhecimento científico.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva UFRGS: Caroline Pissetti, Daniel Paim, Paola Haack, Graciela Volz, Cíntia Simoni, Mariana Ortiz, Thais de Campos, Tatiana Vieira, Gisele Huber, Carmela Piccoli, Verônica Machado, Priscila Guerra, Carine Wingert (*in memoriam*), Vanessa Dias, Vanessa Laviniki, Cristiane Moraes, Mônica Maciel, Héber Hein, Eduardo Costa, Waldemir Neto, Gustavo Machado, Diego Viali, Gustavo Souza, Ana Paula Poeta e Dona Bernardete Franco pela ajuda diária nas tarefas do laboratório e parceria nos momentos descontraídos.

Aos amigos de minha vida que me acompanharam e me incentivaram nessa etapa.

À Embrapa Suínos e Aves, principalmente, à pesquisadora Jalusa Deon Kich pela oportunidade e idealização do projeto.

À empresa Alvap Geradores de Ozônio pela ajuda e disponibilidade nas coletas e realização do experimento.

RESUMO

Tratamentos de descontaminação pós-processamento podem ser adotados como medida complementar às Boas Práticas de Fabricação e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle no processo de abate para diminuir a presença de bactérias patogênicas. O objetivo deste estudo foi testar a eficácia antimicrobiana do ozônio aplicado em carcaças suínas durante o armazenamento na câmara fria. Foi conduzido um experimento em cinco blocos consecutivos que incluíram dois tratamentos: grupo controle (T1) constituído por oito carcaças suínas submetidas ao resfriamento (16 horas a 3°C); grupo tratamento (T2) oito carcaças suínas submetidas a dois períodos de quatro horas de aplicação de até 5 ppm de ozônio durante o período de resfriamento (16 horas a 3°C). Para geração do ozônio foi utilizado um equipamento comercial (Alvap®) com cronômetro e medidor de concentração acoplados. A aplicação do ozônio foi iniciada logo após o fechamento da câmara fria. A superfície das carcaças alocadas em cada um dos grupos de tratamento foi amostrada antes e após o período de 16 horas de resfriamento. As amostras foram analisadas quanto à contagem de mesófilos aeróbios totais e presença de *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. e *Listeria* sp. Isolados de *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* foram caracterizados por Eletroforese de Campo Pulsado. As médias de mesófilos aeróbios totais não diferiram significativamente ($p>0,05$) no grupo T1, antes e depois do resfriamento; enquanto no grupo T2 houve redução significativa ($p<0,05$) após o tratamento. A pesquisa de *Salmonella* sp. e *E. coli* demonstrou aumento significativo ($p<0,05$) no número de carcaças positivas após o resfriamento no grupo T1, enquanto não houve diferença significativa ($p>0,05$) no grupo T2 após o tratamento. Os isolados de *Salmonella* sp. foram identificados como pertencentes aos seguintes sorovares: *S. Derby* (7), *S. Typhimurium* (2), *S. Agona* (10) e *Salmonella* O:4,5 (1). Todos os sorovares, exceto o último, foram encontrados tanto no grupo T1 quanto no grupo T2. Pulsotipos de *S. Agona* e *S. Derby* foram encontrados em carcaças pertencentes ao mesmo bloco do grupo T1, antes e após o resfriamento. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos e períodos amostrados na análise de *Listeria* sp. Nas carcaças positivas, duas espécies foram identificadas: *L. innocua* (5) e *L. monocytogenes* (10). Três pulsotipos foram identificados entre os isolados de *L. monocytogenes*, sendo que o pulsotipo mais frequente incluiu oito isolados identificados em carcaças do grupo T1

amostradas antes e após o resfriamento. Diante dos resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que a aplicação de ozônio na câmara fria, no protocolo testado, foi capaz de reduzir o número de mesófilos aeróbios totais em carcaças suínas, entretanto não foi eficaz na redução de *Salmonella* sp., *Escherichia coli* e *Listeria* sp.

Palavras-chave: carcaça suína, ozônio, *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Listeria* sp.

ABSTRACT

Decontamination post-processing treatments can be adopted as a complementary measure to Good Manufacturing Practices and Hazard Analysis and Points of Critical Control Point in slaughter process to reduce the presence of pathogenic bacteria. The objective of this study was to test the antimicrobial effectiveness of ozone applied in pig carcasses during storage in the cooler. The experiment comprised five consecutive blocks that included two treatments: control group (T1) made up of eight pig carcasses subjected to cooling (16 hours at 3°C); treatment group (T2) with eight pig carcasses subjected to two periods of four hours of application of up to 5 ppm of ozone during the cooling period (16 hours at 3°C). For ozone generation, a commercial equipment (Alvap®) with timer and monitor of concentration coupled was used. The application of ozone was initiated immediately after the closing of the cooler. The surface of the animal carcasses allocated to each treatment group was sampled before and after the 16 hour cooling. The samples were analyzed for total aerobic mesophilic count and presence of Escherichia coli, Salmonella sp. and Listeria sp. Isolates of Salmonella sp. and Listeria monocytogenes were characterized by Pulsed Field Gel Electrophoresis. The average of total aerobic mesophilics did not significantly differ ($p>0,05$) before and after cooling in T1; while in the T2 group it was significantly reduced ($p<0,05$) after treatment. Salmonella sp. and E. coli showed a significant increase ($p<0,05$) in the number of positive carcasses after cooling in the T1 group, while there was no significant difference ($p>0,05$) in T2 after treatment. Salmonella sp. isolates were identified as belonging to the following serovars: S. Derby (7), S. Typhimurium (2), S. Agona (10) and Salmonella O:4.5 (1). All serotypes, except Salmonella O: 4.5 (1), were found in both groups. Pulsotypes of S. Agona and S. Derby were found in carcasses from a same batch of T1, before and after cooling. There was no significant difference ($p>0,05$) between treatments and periods of sampling regarding Listeria sp. In positive carcasses, two species were identified: L. innocua (5) and L. monocytogenes (10). Three pulsotypes were identified among the isolates of L. monocytogenes, whereas the most frequent pulsotype included eight isolates identified in group T1 carcasses sampled before as well as after cooling. It was concluded that the tested protocol of ozone application during the cooling step is able

to reduce the number of total aerobic mesophilic on pig carcasses, whereas it is not effective in reducing Salmonella sp., Escherichia coli and Listeria sp.

Key-words: *pig carcasses, ozone, Salmonella sp., Escherichia coli, Listeria sp.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Fluxograma simplificado da linha de abate de suínos desde a chegada dos animais até o resfriamento da carcaça no matadouro-frigorífico...	21
Figura 2-	Perfis de PFGE de isolados de <i>Salmonella</i> sp. clivados com XbaI.	41
Figura 3-	Perfis de PFGE de isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> clivados com AscI e ApaI.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Médias e erros-padrão da contagem de mesófilos aeróbios totais, transformada em logaritmo na base 10, em carcaças amostradas antes e após 16 horas de resfriamento em grupo de carcaças tratadas com dois ciclos de aplicação de ozônio até 5 ppm (T2) e grupo controle (T1).	39
Tabela 2-	Percentual de carcaças positivas para <i>Escherichia coli</i> antes e após 16 horas de resfriamento em grupo de carcaças tratadas com dois ciclos de aplicação de ozônio até 5 ppm (T2) e grupo controle (T1).	40
Tabela 3-	Percentual de carcaças positivas para <i>Salmonella</i> sp. antes e após 16 horas de resfriamento em grupo de carcaças tratadas com dois ciclos de aplicação de ozônio até 5 ppm (T2) e grupo controle (T1).	40
Tabela 4-	Percentual de carcaças positivas para <i>Listeria</i> sp. antes e após 16 horas de resfriamento em grupo de carcaças tratadas com dois ciclos de aplicação de ozônio até 5 ppm (T2) e grupo controle (T1).	42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	Perigos microbiológicos na cadeia de produção suína.....	16
2.1.1	Carne suína e Doenças Transmitidas por Alimentos	16
2.1.2	O suíno como carreador de bactérias causadoras de DTA.....	18
2.2	Controle do processo de produção da carne suína.....	19
2.2.1	Processo de abate e a contaminação de carcaças.....	20
2.2.1.1	Garantia da inocuidade do produto.....	23
2.2.1.2	Monitoramento do processo.....	24
2.2.1.3	Descontaminação da superfície da carcaça.....	26
2.3	Ozônio: antimicrobiano na indústria de alimentos.....	27
2.3.1	Características do ozônio.....	27
2.3.2	Efeito do ozônio em bactérias.....	29
2.3.3	Utilização do ozônio na indústria de alimentos.....	30
2.3.3.1	Tratamento com ozônio nos produtos cárneos.....	31
2.3.3.2	Oxidação.....	32
2.3.4	Os riscos da utilização do ozônio.....	33
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1	Determinação da concentração de uso do ozônio.....	34
3.2	Aplicação de ozônio em carcaças suínas durante o período de resfriamento.....	34
3.3	Análise microbiológica.....	35
3.3.1	Contagem de mesófilos aeróbios totais e <i>Escherichia coli</i>	35
3.3.2	Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp.	36
3.3.3	Pesquisa de <i>Listeria</i> sp.	36
3.3.4	Eletroforese em Campo Pulsado.....	37
3.4	Análise estatística.....	37
4	RESULTADOS.....	39
5	DISCUSSÃO.....	43

6	CONCLUSÃO.....	47
	REFERÊNCIAS.....	48
	APÊNDICE A.....	62
	APÊNDICE B.....	63

1 INTRODUÇÃO

A carne suína é a proteína de origem animal mais consumida no mundo; para suprir essa demanda, a produção mundial atinge 104 milhões de toneladas de carne anualmente (FAO, 2014). Atualmente, a China, a União Europeia (UE) e os Estados Unidos (EUA) contribuem com 82% dessa produção. Nesse panorama, o Brasil é responsável pela produção de 3,42 milhões de toneladas de carne suína ao ano, das quais 517 mil toneladas são destinadas ao mercado externo, ocupando o 4º lugar no *ranking* mundial de produção e exportação (ABPA, 2015b). No país, a Região Sul é responsável por 61% da produção total e o estado de Santa Catarina é o maior produtor. Considera-se ainda baixo o consumo brasileiro de carne suína, quando comparado à carne bovina e de frango; no entanto, 2,9 milhões de toneladas produzidas no Brasil são destinadas ao mercado interno, atingindo 14,5 kg *per capita* ao ano, sendo o produto industrializado o mais consumido (ABPA, 2015a).

Produtos de origem animal são os principais veículos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) de etiologia bacteriana, sendo seu papel relevante para a saúde pública e para economia dos países. A subnotificação de casos de DTA no Brasil dificulta o conhecimento da sua real prevalência, bem como dos custos oriundos de seu tratamento, entretanto levantamentos norte-americanos estimam que as perdas por DTA custem, anualmente, mais de 15,6 milhões de dólares (FLINN, 2014). Nesse sentido, diante do grande consumo mundial de carne suína, deve-se considerar o risco desse alimento ser o responsável pela infecção nos consumidores. Além disso, a carne contaminada pode gerar um impacto direto no mercado externo brasileiro, provocado pelos embargos dos países importadores quando a presença de bactérias patogênicas é detectada nos produtos (TIPA, 2013).

A crescente preocupação mundial com DTA tem levado a grandes mudanças na produção de alimentos de origem animal, implicando em programas dirigidos ao controle de patógenos desde a granja até a mesa do consumidor. A carne contaminada pode ter sua origem no abate, onde suínos portadores de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. e *Yersinia enterocolitica* contaminam o ambiente, equipamentos e outras carcaças dentro do matadouro, disseminando esses microrganismos. As Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), programas de higiene e de processo, são essenciais dentro da indústria a fim de controlar essa disseminação. Apesar disso, algumas carcaças suínas podem permanecer

contaminadas após as etapas de controle microbiano no matadouro (HUFFMAN, 2002), chegando ao varejo produtos contaminados por bactérias causadoras de DTA. Estes produtos podem ser a fonte primária de contaminação cruzada para outros alimentos ou fonte direta de infecção para o consumidor. Diante disso, alternativas pós-processamento têm sido sugeridas, como medidas complementares aos programas existentes, na tentativa de garantir a inocuidade da carne.

A aplicação de substância química na carcaça durante o processo de abate para reduzir os patógenos é conhecida como tratamento de descontaminação (BARCO *et al.*, 2014). A utilização desses tratamentos depende da permissão dos países produtores e compradores. Nos EUA, o *Food Safety and Inspection Service* (FSIS) sugere que pelo menos um tratamento antimicrobiano seja realizado antes da refrigeração da carcaça e, além disso, sugere que lavagens com substâncias antimicrobianas sejam realizadas depois das etapas críticas do abate para evitar contaminações cruzadas (USDA, 1999). Ao contrário, a UE adota uma política mais conservadora e não utiliza substâncias antimicrobianas em carcaças suínas. Embora tenha permitido pesquisas sobre a eficácia do tratamento com substâncias químicas, até o momento, os estudos disponíveis são considerados insuficientes para aprovação de qualquer substância testada (EFSA, 2014). Nesse sentido, o Brasil segue uma política similar à europeia e, por essa razão, ainda não aplica produtos sanitizantes nas carcaças.

A busca de tratamentos com descontaminantes deve considerar alguns aspectos: a segurança da substância em si (ser atóxica), o seu efeito em relação ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana, a eficácia para diminuir o nível de contaminação de microrganismos patogênicos e a ausência de resíduos no alimento (GUIDANCE, 2006). Diante desses pré-requisitos, o ozônio apresenta características desejáveis e parece ser promissor como sanitizante em carcaças. O gás possui meia-vida curta, amplo espectro antimicrobiano e ausência de subprodutos tóxicos aos seres humanos. Sua eficácia já é relatada na água, vegetais, frutas e em alguns produtos de origem animal. No entanto, poucos estudos com o gás em carcaças suínas são relatados. A partir disso, o objetivo do estudo foi avaliar a eficácia da aplicação de ozônio em carcaças suínas, durante o período de resfriamento na câmara fria, em termos de redução das contagens médias de mesófilos aeróbios totais e do número de carcaças positivas para *Escherichia coli* e para os gêneros *Salmonella* e *Listeria*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Perigos microbiológicos na cadeia de produção da carne suína

2.1.1 Carne suína e Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA)

Os consumidores estão cada vez mais conscientes da importância da qualidade e inocuidade dos alimentos (LADO; YOUSEF, 2002). Embora existam cuidados e controles durante o processamento, os alimentos de origem animal são, ainda, os principais veículos de Doenças Transmitidas por Alimento (DTA) para os seres humanos. Essas enfermidades impactam a saúde pública, devido à sua morbidade e custo de seu tratamento (CORANTIN *et al.*, 2005).

Segundo estatísticas norte-americanas, 48 milhões de consumidores são acometidos por DTA a cada ano; desse total, 128 mil são hospitalizados e 3 mil vêm a óbito (CDC, 2014a). Os produtos cárneos foram responsáveis por 1023 surtos investigados no período de 2002 a 2011 nos EUA; desse total, 164 surtos foram relacionados ao consumo de carne suína (CENTER FOR SCIENCE IN THE PUBLIC INTEREST, 2014). No Brasil, o levantamento de dados relativos à DTA ainda é incipiente, porém a Secretaria de Vigilância em Saúde reportou 208 surtos relacionados ao consumo de carne suína no período de 2000 a 2013 (SVS, 2013).

Salmonella enterica subsp. *enterica* sorovar Typhimurium (*S. Typhimurium*), *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) e *Yersina enterocolitica* (*Y. enterocolitica*) são as principais bactérias causadoras de DTA que têm sido associadas ao consumo de carne suína (FOSSE; SEEGER; MAGRAS, 2009; NATHUES *et al.*, 2013). Dentre essas, *Salmonella enterica* é considerada a de maior frequência em carne suína (SCALAN *et al.*, 2011).

Estima-se que ocorram dezenas de milhões de casos de salmonelose anualmente no mundo (WHO, 2013). Em 2012, *Salmonella* sp. foi responsável por 91.034 casos notificados na União Europeia (SCIENTIFIC, 2014). Embora uma grande parte dos casos de salmonelose humana seja associada ao consumo de outros alimentos, na Holanda e na Alemanha, estima-se que de 15 a 20% dos casos sejam relacionados ao consumo de produtos suínos (LO FO WONG *et al.*, 2002). Na literatura, é possível encontrar o relato de diversos surtos de salmonelose associados ao consumo de carne suína. Nos EUA, foram reportados 38 indivíduos infectados por *S.*

Typhimurium após consumo de carne suína durante um evento comunitário (FOLGER *et al.*, 2014). Em maio de 2010, um elevado número de casos de salmonelose ocorridos na França foi associado ao consumo de linguiça suína contaminada (BONE *et al.*, 2010). No Japão, um surto envolvendo 105 acometidos foi causado pela ingestão de carne suína contaminada por *S. Typhimurium* (MURASE *et al.*, 2000). *Salmonella* Give foi identificada em carne suína em um surto causando 115 casos de gastroenterites na Alemanha (JANSEN *et al.*, 2005). No mesmo país, outro surto, associado ao consumo de produtos de origem suína contaminada por *S. München*, acometeu 198 pessoas (BUCHHOLZ *et al.*, 2005). Na Itália, em 2004, um surto envolvendo 63 infectados por *S. Typhimurium* fagotipo DT104A foi relacionada ao consumo de salame de carne suína; além disso, o mesmo fagotipo foi identificado em suínos criados na região (LUZZI *et al.*, 2007).

Em 2012, aproximadamente 200 kg de carne suína foram retirados do mercado norte americano devido à suspeita de contaminação por *L. monocytogenes* (USDA, 2013). Porém, na carne in natura, a bactéria geralmente encontra-se em número baixo a moderado, enquanto os alimentos envolvidos em surtos de listeriose são aqueles em que o microrganismo encontra-se em níveis elevados (THÉVENOT; DERNBURG; VERNIZY-ROZAND, 2006). Dessa forma, a carne suína não tem sido o principal veículo nos casos de listeriose, apesar de haver relato de surtos atribuídos ao consumo de produtos suínos. Na década de 90, dois surtos causados por *L. monocytogenes* sorotipo 4b foram investigados na França. O primeiro surto resultou em 22 casos de aborto e 63 óbitos após o consumo de língua suína contaminada. No outro surto, nove casos de aborto e 12 de partos prematuros foram associados ao consumo de patê suíno contaminado por *L. monocytogenes* (JACQUET *et al.*, 1995; GOULET *et al.*, 1998). O mesmo agente presente em embutido cozido de carne suína foi implicado na ocorrência de meningite em paciente idosa na Suécia (LONCAREVIC *et al.*, 1997).

Ao contrário, a carne suína e seus produtos derivados são considerados os principais envolvidos em casos de yersiniose (BUCHER *et al.*, 2008). *Yersinia enterocolitica* foi considerada como um dos principais agentes patogênicos bacterianos relacionados à carne suína, porém apresentando menor frequência em DTA comparado à *Salmonella* sp. (SCIENTIFIC, 2011a; SCIENTIFIC, 2011b). Entre os relatos na literatura, encontra-se um surto causado por *Y. enterocolitica* O:3 em crianças nos EUA (JONES *et al.*, 2003). Além deste, *Yersinia enterocolitica* O:9 foi identificada como

agente causador de um surto envolvendo 11 acometidos na Noruega, em 2006, após a ingestão de produto de origem suína (GRAHEK-OGDEN *et al.*, 2007).

2.1.2 O suíno como carreador de bactérias causadoras de DTA

Os suínos portadores de bactérias causadoras de DTA não apresentam sinais clínicos ou lesões decorrentes da infecção. A origem da infecção desses animais pode ser, entre outras: outro suíno, o ambiente e a ração. O controle da transmissão é complexo, o que torna possível a chegada de animais positivos para *S. enterica*, *L. monocytogenes* e *Y. enterocolitica* ao abate (FOSSE; SEEGERS; MAGRAS, 2009; LO FO WONG *et al.*, 2002; FARZAN *et al.*, 2010; SCIENTIFIC, 2011b).

Com exceção de *S. Choleraesuis*, a infecção por *Salmonella* sp. costuma ser assintomática no suíno e sua excreção nas fezes pode ocorrer de forma intermitente (BERENDS *et al.*, 1996; DE BUSSER *et al.*, 2013). Após a infecção, as tonsilas e linfonodos (jejuno e íleo-cecais) são os principais sítios de colonização (SCHERER *et al.*, 2008). Sabe-se que as tonsilas podem albergar um elevado número de *S. Typhimurium*, desempenhando um papel importante na invasão e disseminação do agente que sob condições de estresse, pode ser eliminado nas fezes do suíno portador, contaminando o ambiente, sendo transmitido a outros animais (BERENDS *et al.*, 1996; FEDORKA-CRAY *et al.*, 1994). Dessa forma, a prevalência de animais infectados pode aumentar da granja até o pré-abate. No abate, portanto, o conteúdo fecal, as tonsilas e os linfonodos desses suínos podem ser a fonte primária da contaminação de carcaças (ALPIGIANI *et al.*, 2014; BOLTON *et al.*, 2002; SCIENTIFIC, 2010).

As tonsilas têm sido identificadas como o principal sítio de colonização de *L. monocytogenes* no suíno. Embora na maioria dos relatos a bactéria não seja encontrada em conteúdo intestinal dos animais, ocasionalmente pode ser isolada de fezes (BUNCIC, 1991; KANUGANTI *et al.*, 2002; SKOVGAARD; NORRUNG, 1989). Estudos ainda são necessários para caracterizar e quantificar o risco da infecção de suínos nas fases anteriores ao abate para a contaminação de carcaças em matadouros (FOSSE; SEEGERS; MAGRAS, 2009). Entretanto, observa-se que a prevalência de isolamento do microrganismo geralmente é baixa e aumenta ao longo da cadeia de produção (THÉVENOT; DERNBURG; VERNZOY-ROZAND, 2006). Frequentemente, o gênero *Listeria* está associado à contaminação residual do ambiente do matadouro. Nesse sentido, foi demonstrado que *L. monocytogenes* pode permanecer

residualmente no ambiente dos abatedouros, resistindo à limpeza e desinfecção, por períodos superiores a um ano (GIOVANNACCI *et al.*, 1999).

Suínos podem ser portadores assintomáticos de cepas patogênicas de *Y. enterocolitica* para humanos, sendo carreadores no trato gastrintestinal, cavidade oral, tonsilas e linfonodos submaxilares ao abate (BOLTON; IVORY; MC DOWELL, 2013; SCIENTIFIC, 2007). Sugere-se que o contato entre os animais seja um importante fator para a transmissão (PILON; HIGGINS; QUESSY, 2000). A prevalência no rebanho pode ser alta, chegando a 88% de animais positivos em tonsilas e língua ao abate. Nas fezes, a prevalência pode ser baixa, pois a excreção da bactéria tende a diminuir após o 70º dia de infecção (BOLTON; IVORY; MC DOWELL, 2013; FREDRIKSSON-AHOMAA *et al.*, 2007; PILON; HIGGINS; QUESSY, 2000). Estudos demonstram que carcaças de suínos recém-abatidos podem estar contaminadas com cepas patogênicas advindas das tonsilas, cavidade oral e das fezes, como resultado da contaminação cruzada durante o abate (SCIENTIFIC, 2007). As cepas mais virulentas são mais encontradas nas tonsilas e na língua e, nesse sentido, Nesbakken *et al.*, (2003) demonstraram que a separação da cabeça, incisão de linfonodos submaxilares, remoção da língua e tonsilas representam um grande risco para que ocorra a contaminação de bactérias patogênicas nas carcaças.

2.2 Controle do processo de produção da carne suína

Ao longo da cadeia de produção suína, há muitas etapas que podem alterar a prevalência de patógenos (HURD *et al.*, 2001). O rastreamento de microrganismos presentes nos suínos ao abate evidencia a origem desses patógenos na granja, transporte e pré-abate (BOLTON *et al.*, 2002; LAUKANNEN *et al.*, 2008). No matadouro, o processo de abate objetiva impedir a contaminação da carne e derivados, porém, mesmo em plantas com alto padrão de higiene, bactérias patogênicas podem ser eventualmente encontradas ao final do processo (BOLDER, 1997; HUFFMAN, 2002). Por isso, programas de controle devem incluir tanto a produção primária quanto o processo de abate, inclusive medidas pós-processamento (NØRRUNG; BUNCIC, 2008; HUFFMAN, 2002).

A identificação de fatores de risco para agentes patogênicos de origem alimentar na granja de criação dos suínos é necessária para controlar a infecção nos animais e

auxiliar na gestão dos riscos relacionados à inspeção da carne. Existem poucos estudos de fatores de risco para *L. monocytogenes* e *Y. enterocolitica*, entretanto fatores de risco para *Salmonella* sp. são bastante estudados (FOSSE; SEEGERS; MAGRAS, 2009). É amplamente reconhecido que a ração e os fatores relacionados à biossegurança são cruciais para o controle na granja (FOSSE; SEEGERS; MAGRAS, 2009; LANGVAD *et al.*, 2006).

A proporção de suínos infectados com bactérias patogênicas pode aumentar durante o transporte entre a granja e o matadouro (HURD *et al.*, 2002; LAUKKANEN *et al.*, 2008). Animais aparentemente saudáveis na granja podem carrear *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* e *Salmonella* sp. em seu trato gastrointestinal ou em linfonodos e tonsilas. Esses portadores, quando submetidos ao estresse do transporte e mudança de ambiente aumentam a excreção fecal dessas bactérias (BERENDS *et al.*, 1996; KANUGANTI *et al.*, 2002; SCIENTIFIC, 2007). Além disso, o transporte e a estabulação incluem jejum que pode aumentar o estresse dos animais (HURD *et al.*, 2001). Portanto, o adequado transporte e estabulação no matadouro, com separação de lotes, limpeza e desinfecção de caminhões e pocilgas de descanso, bem como tempo inferior a 18 horas de jejum, contribuem para o controle da transmissão e para o bem-estar animal (DELHALLE *et al.*, 2008; MILNES *et al.*, 2009; LUDTKE *et al.*, 2010).

2.2.1 Processo de abate e a contaminação de carcaças

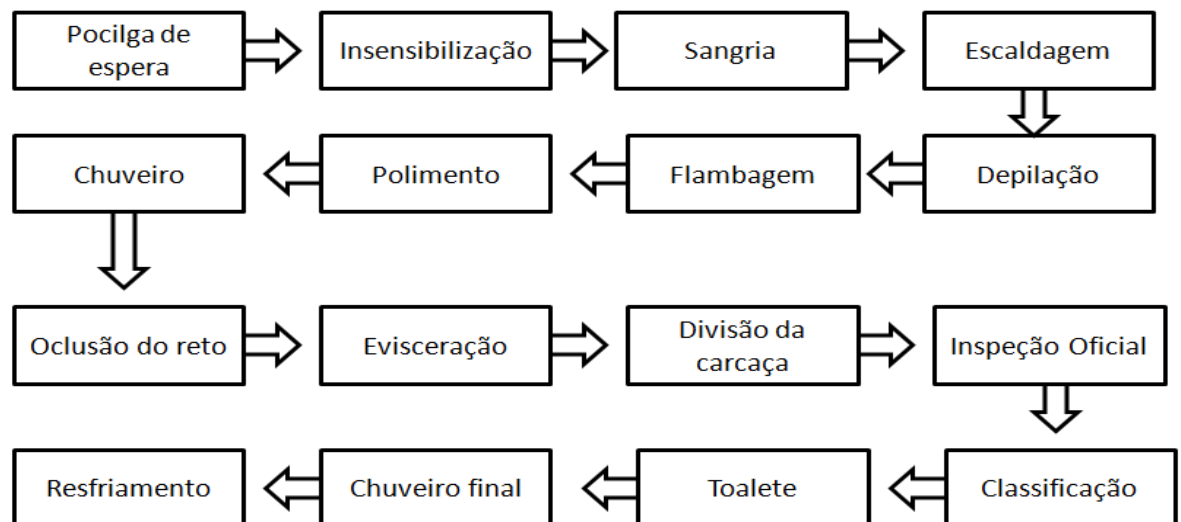
O tempo de descanso no matadouro, além de reduzir o estresse dos animais após o transporte, existe para cumprir o tempo de jejum necessário e realizar a inspeção *ante mortem* (LUDTKE *et al.*, 2010). O tempo mínimo regulamentado para o descanso varia entre países, porém grandes intervalos demonstraram aumentar o risco de infecção por *Salmonella* sp. (DELHALLE *et al.*, 2008). A inspeção *ante mortem* durante o tempo de descanso auxilia na certificação da saúde do suíno, porém animais portadores de bactérias patogênicas passam despercebidos nos procedimentos de inspeção, podendo ser fonte de contaminação cruzada das carcaças durante o processamento (SCIENTIFIC, 2011b; ALPIGIANI *et al.*, 2014).

Microrganismos presentes na pele, no intestino, fezes, linfonodos e tonsilas dos animais que estão destinados ao abate podem contaminar o ambiente do matadouro, a partir do qual podem ser disseminados durante o processamento de alimentos. Diante disso, medidas para controlar os fatores de risco e higiene na planta de abate devem ser

tomadas a fim de reduzir a prevalência de bactérias causadoras de DTA nas carcaças e vísceras dos animais (BORCH; NESBAKKEN; CHRISTENSEN, 1996; KANUGANTI *et al.*, 2002; SWANENBURG *et al.*, 2001b).

A redução desses patógenos em carcaças durante o processo de abate tem importância fundamental para a saúde pública (LO FO WONG *et al.*, 2002; LORETZ; STEPHAN; ZWEIFEL, 2011a; VAN DAMME; HABIB; DE ZEUTTER, 2010). No fluxograma de abate de suínos (Figura 1), há etapas capazes de reduzir a contaminação, enquanto outras favorecem o aumento das contagens microbianas em carcaças.

Figura 1. Fluxograma simplificado da linha de abate de suínos desde a chegada dos animais até o resfriamento da carcaça no matadouro-frigorífico.



Fonte: o próprio autor

A escaldagem é a primeira etapa da linha de abate que reduz a contagem bacteriana total das carcaças, em níveis estimados entre 1,5 log até 2,8 log UFC/cm². A temperatura da água, mantida entre 60-64°C é capaz de destruir um número considerável de bactérias entéricas (BOLTON *et al.*, 2002; HALD *et al.*, 2003; WHEATLEY; GIOTIS; MCKEVITT, 2014). Contudo, em temperaturas inferiores, os microrganismos podem sobreviver no tanque de escalda propiciando a contaminação cruzada de carcaças (BOLTON; IVORY; MC DOWELL, 2013).

Durante a etapa de depilação ocorre recontaminação, podendo contribuir com aumento de 2 log UFC/cm² de mesófilos totais nas carcaças (PEARCE *et al.*, 2004; NAMVAR; WARRINER, 2006). A depiladeira é uma das principais fontes de contaminação bacteriana no processo de abate, pois o material fecal pode extravasar do

intestino, contaminando o interior do equipamento e as carcaças (BORCH; NESBAKKEN; CHRISTENSEN, 1996; HALD *et al.*, 2003; NAMVAR; WARRINER, 2006).

Dessa forma, o chamuscamento ou flambagem, etapa em que a temperatura da superfície da carcaça pode atingir 100°C, é crucial para o controle da contaminação bacteriana superficial, alcançando reduções de 1,8 a 3,0 log UFC/cm² de mesófilos totais (BORCH; NESBAKKEN; CHRISTENSEN, 1996; BOLTON *et al.*, 2002; PEARCE *et al.*, 2004; WHEATLEY; GIOTIS; MCKEVITT, 2014).

O polimento, realizado após o chamuscamento, pode contribuir para o aumento das contagens bacterianas e, por isso, a condição de higiene do equipamento é extremamente importante, levando em consideração que, a partir da flambagem, não existem etapas para reduzir a carga microbiana. Portanto, a contaminação final da carcaça será determinada pelo o que ocorre no polimento e etapas subsequentes na zona limpa (BERENDS *et al.*, 1997; WHEATLEY; GIOTIS; MCKEVITT, 2014; YU *et al.*, 1999).

Na zona limpa, a oclusão do reto é outro importante ponto crítico do processo, e deve ser realizada antes da evisceração, pois objetiva evitar o extravasamento de fezes (BRASIL, 1995; BORCH; NESBAKKEN; CHRISTENSEN, 1996; NESBAKKEN *et al.*, 1994).

Instrumentos e equipamentos podem ser contaminados por agentes zoonóticos durante a abertura das cavidades, da papada, divisão da carcaça e inspeção (palpação, corte ou a incisão de órgãos) (SCIENTIFIC, 2010). Por isso, os utensílios devem ser lavados e sanitizados após cada operação, em esterilizadores a 82°C por 20 segundos, para evitar a contaminação cruzada (BRASIL, 2005; BOLTON *et al.*, 2002). Delhalle *et al.* (2008) demonstraram que a limpeza e a desinfecção da serra durante o processo é benéfica na redução de *Salmonella* sp. *Escherichia coli* e bactérias mesófilas aeróbias totais.

Na evisceração, o rompimento ou corte de alguma víscera com extravasamento do líquido gastrointestinal pode ocorrer como falha do processo (ANDERSEN, 1988; NIELSEN; WEGENER, 1997). Wheatley, Giotis e Mckevitt (2014) encontraram aumento nas contagens de mesófilos totais e enterobactérias nas regiões da barriga e da papada quando amostradas após a evisceração. Nas grandes plantas de abate, a alta velocidade da linha de abate aumenta os riscos de contaminação. Diminuir a velocidade

nesse ponto da linha de abate pode ajudar na execução correta da etapa (DE BUSSER *et al.*, 2013; SCIENTIFIC, 2011b).

A cabeça e a cavidade oral, região na qual estão a língua, tonsilas e linfonodos, são consideradas de alto risco. Existe uma significativa correlação entre a prevalência de *Salmonella* sp. e *Yersinia enterocolitica* presente nas tonsilas e carcaças contaminadas ao final do abate (SCIENTIFIC, 2010; VAN DAMME; HABIB; DE ZEUTTER, 2010). A separação completa da cabeça antes de qualquer manipulação pode reduzir o risco de contaminação cruzada (SCIENTIFIC, 2011b).

O resfriamento é a última etapa do fluxograma e tem como objetivo prolongar a fase de latência dos microrganismos, não sendo capaz de eliminar a carga microbiana existente (CHANG; MILLS; CUTTER, 2003; YU *et al.*, 1999). Alguns tipos de resfriamento, com temperaturas mais baixas que as usuais e ventilação forçada na carne podem resultar em dessecação, reduzindo o número de bactérias viáveis (CHANG; MILLS; CUTTER, 2003). No entanto, dependendo da temperatura, velocidade do ar, umidade, tempo de exposição e espaçamento entre as carcaças, o resfriamento pode resultar em aumento da contaminação bacteriana (BOLTON *et al.*, 2002).

2.2.1.1 Garantia da inocuidade do produto

O processo de abate envolve etapas que podem contribuir para a contaminação microbiana das carcaças (BOLTON *et al.*, 2002; SCIENTIFIC, 2007). Por isso, programas de garantia de inocuidade de alimentos devem ser implementados na indústria para assegurar o controle sanitário: as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e os Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO), ambos pré-requisitos para o sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (BRASIL, 2005).

As BPF são um conjunto de medidas adotadas pela indústria para garantir a qualidade sanitária do alimento (ANVISA, 2006). Essas práticas referem-se a condições ideais de higiene no desempenho do processo, no operador, no equipamento e no ambiente de produção, não abordando os riscos específicos (FORSYTHE, 2013). O PPHO, por sua vez, descreve todos os procedimentos de limpeza e sanitização que devem ser realizados, abrangendo a limpeza das superfícies, dos equipamentos e instalações do frigorífico, além da periodicidade de sua execução (antes, durante e depois das operações) (SÃO PAULO, 2003).

O APPCC é uma abordagem científica do controle do processo. Foi desenvolvido para controlar os perigos que possam ocorrer ao longo da cadeia de produção. É necessário identificar os perigos físicos, químicos e biológicos em todas as etapas do processo, prevendo falhas e descrevendo medidas preventivas (SWANENBURG *et al.*, 2001a; USDA, 1999). O Ponto Crítico de Controle (PCC) dentro do APPCC é a etapa essencial em que há o controle do processamento, prevenindo, eliminando ou reduzindo a níveis aceitáveis os perigos existentes. São determinados de acordo com a análise de risco do fluxograma de produção de cada estabelecimento, levando em conta os níveis de contaminação em cada etapa da produção. Os PCC's devem ser procedimentos quantificáveis (determinando os limites críticos), monitorados e passíveis de correção durante a produção (FORSYTHE, 2013; GILL; JONES, 1997). No fluxograma de abate, estudos indicam que a escaldagem possa ser um PCC dentro do APPCC, pois chega a reduções de 2,5 log UFC de bactérias nas carcaças. Entretanto é necessário que a temperatura da água esteja acima de 62°C para assegurar a eliminação dos patógenos. Sugere-se também a etapa de flambagem, entretanto é necessário padronizar a temperatura de funcionamento das chamas e duração do procedimento, pois esses parâmetros são raramente observados (PEARCE *et al.*, 2004). Na zona limpa, alguns autores recomendam que a evisceração possa ser considerada um PCC em grandes linhas de abate, desde que os limites críticos sejam determinados (BORCH; NESBAKKEN; CHRISTENSEN, 1996; BOLTON *et al.*, 2002). Outra etapa indicada como último PCC é a refrigeração, no entanto, para isso, deve haver adequada temperatura e registros durante o armazenamento (USDA, 1999).

2.2.1.2 Monitoramento do processo

Existem duas maneiras para verificar se as práticas de higiene e do APPCC resultaram em níveis aceitáveis de contaminação da carcaça: por inspeção visual das carcaças e por análises microbiológicas de amostras colhidas na superfície de carcaça (LINDBLAD; BERKING, 2013).

O exame visual de contaminação fecal é baseado em fatores organolépticos, visão e olfato, os quais não são suficientes para garantir a ausência de patógenos (PENSABENE; FIDDLER, 1996). Segundo a legislação, a contaminação com fezes deve ser retirada rapidamente com faca, caso seja possível, ou deve ser realizado o descarte da carcaça (BRASIL, 1952).

Para monitoramento microbiológico da carcaça, são adotados alguns microrganismos como indicadores. O microrganismo indicador não identifica a presença de patógenos na carcaça, mas demonstra o nível de contaminação indicando falha do processo (NAUTA *et al.*, 2013).

Dentre os microrganismos indicadores, aqueles que habitam o intestino são preferidos, porque podem ser facilmente detectados e estão correlacionados com a presença de patógenos entéricos. Nesse sentido, a quantificação de *Enterobacteriaceae* e *E. coli* tem sido as mais comumente empregadas. A presença de elevado número de *Enterobacteriaceae* indica contaminação de origem entérica ou ambiental, enquanto a presença de *E. coli* nas carcaças está mais associada à contaminação fecal (GHAFIR *et al.*, 2008; BARCO *et al.*, 2014).

Para monitorar a qualidade do processamento de alimentos, a contagem de mesófilos aeróbios totais em placa é utilizada. Nesse caso, não há relação com contaminação de origem fecal, altos níveis são geralmente correlacionados com baixa qualidade de higiene do processo e redução da vida de prateleira (BARROS *et al.*, 2007). Psicrotóxicos, como *Pseudomonas* sp., podem ser usados no monitoramento de deterioração de produtos que são estocados em baixas temperaturas, uma vez que são os principais deteriorantes da superfície desses produtos (BARCO *et al.*, 2014).

O monitoramento de diferentes microrganismos indicadores é incluído nos programas de controle de patógenos e para verificação do APPCC. Além disso, a pesquisa de *Salmonella* sp. tem sido incluída como indicador de redução de patógenos. É escolhida porque é uma das causas mais comuns de DTA e todas as intervenções direcionadas a sua redução são benéficas na redução da contaminação por outro patógeno entérico. Em carcaças suínas, o programa de redução de patógenos americano investiga *E. coli* e *Salmonella* sp. (USA, 1996). A União Europeia (EU), além de *Salmonella* sp., monitora mesófilos aeróbios totais e *Enterobacteriaceae* (EUROPEAN COMMISSION, 2007; EUROPEAN COMMISSION, 2014). O Brasil, por meio da Circular nº 130/2007 do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento, adotou os mesmos parâmetros da UE (BRASIL, 2007). Em todos os casos, ações corretivas são exigidas quando os resultados estiverem acima dos limites críticos estabelecidos (NAUTA *et al.*, 2013; BARCO *et al.*, 2014).

Acredita-se que os critérios microbiológicos possam não refletir isoladamente todas as condições operacionais de um matadouro (HUTCHISON *et al.*, 2007). Entretanto, o acompanhamento regular e continuado do processo de higiene em plantas

é procedimento essencial para o controle sanitário do sistema, a fim de assegurar a inocuidade do alimento (WHEATLEY; GIOTIS; MCKEVITT, 2014).

2.2.1.3 Descontaminação da superfície da carcaça

A dificuldade em assegurar a ausência de patógenos em carcaças tem estimulado a pesquisa e o desenvolvimento de novas tecnologias que podem ser agregadas ao processo (BOLDER, 1997; HUFFMAN, 2002). Tratamentos físicos ou químicos podem ser usados na tentativa de reduzir a contaminação bacteriana de carcaças em matadouros de suínos, entretanto não devem ser utilizados como medida primária de controle (HUGAS; TSAGARIDA, 2008; MORILD; OLSEN; AABO, 2011). Estratégias de intervenção no controle de patógenos de origem alimentar têm sido sugeridas, porém seu desempenho depende do entendimento da fisiologia e sobrevivência dos microrganismos durante e após o tratamento (LADO; YOUSEF, 2002).

O calor é o tratamento físico tradicionalmente aplicado sob forma de pasteurização e esterilização para garantir a segurança microbiológica dos alimentos. Entretanto, o calor excessivo pode desnaturar proteínas, causar escurecimento não-enzimático, provocar a perda de vitaminas e formar compostos aromáticos voláteis indesejáveis nos alimentos (LADO; YOUSEF, 2002). Por isso, tecnologias não térmicas têm sido investigadas: ultra-som, processamento por alta pressão, campo elétrico pulsado, radiações iônicas e não-iônicas. Todos esses tratamentos estão sendo investigados como alternativas para o processamento de alimentos (BINTSIS; LIPOPOULOU-TZANETAKI; ROBINSON, 2000; MATHAVI *et al.*, 2013; BUTZ; TAUSCHER, 2002).

Em relação ao tratamento químico, os mais citados são os ácidos orgânicos, ácidos inorgânicos, agentes clorados e agentes oxidantes (BOLDER, 1997). Em relação ao tratamento de carcaças de suínos, os ácidos orgânicos (ácido láctico, cítrico e acético) são os mais empregados (LORETZ; STEPHAN; ZWEIFEL, 2011b; EPLING; CARPENTER; BLANKENSHIP, 1993; PIPEK *et al.*, 2006; EGGENBERGER-SOLORZANO *et al.*, 2002). Entretanto, a atividade bactericida dos ácidos pode ser alterada pela presença de matéria orgânica e alguns agentes podem ser prejudiciais à saúde humana e apresentar propriedades corrosivas e instabilidade em solução (LORETZ; STEPHAN; ZWEIFEL, 2011b).

O cloro é amplamente utilizado na indústria de alimentos, porém tem eficácia comprometida quando há presença de matéria orgânica e sua utilização na indústria de alimentos tem causado preocupação em relação aos resíduos gerados (BUNCIC; SOFOS, 2012; LADO; YOUSEF, 2002; ZEYNEP; GREENE; SEYDIM, 2004).

No grupo dos oxidantes, o ozônio tem despertado grande interesse, pois sofre rápida dissociação em oxigênio sem deixar resíduos perigosos à saúde humana (TIWARI *et al.* 2010; ACHEN; YOUSEF, 2001). Em 1982, a Food and Drug Administration (FDA) considerou o ozônio como uma substância *Generally Recognized as Safe* (GRAS) permitindo seu uso na indústria de alimentos como sanitizante de embalagens de água (RICE; GRAHAM, 2001).

2.3 Ozônio: antimicrobiano na indústria de alimentos

2.3.1 Características do ozônio

O ozônio é um oxigênio triatômico (O_3), molécula altamente instável, formado pela adição de mais um átomo de oxigênio ao oxigênio molecular (O_2). Ocorre naturalmente na atmosfera, mas pode ser gerado comercialmente através do efeito corona ou de radiação ultravioleta quando há passagem de moléculas de O_2 (MUKHOPADHWYAY; RAMASWAMY, 2012). Assim, o O_2 divide-se em dois átomos de oxigênio, que são altamente reativos. Quando um átomo de oxigênio livre encontra uma molécula de O_2 , este se combina para formar o ozônio, ainda mais instável. Devido a essa instabilidade, degrada-se rapidamente a O_2 . O átomo de oxigênio livre liberado pode recombinar-se a outro átomo de oxigênio livre para formar O_2 ou combinar-se com outras moléculas químicas que sofrerão oxidação (ZEYNEP; BEVER; GREENE, 2004). Em soluções, decompõe-se gradualmente, produzindo, por sua vez, radicais hidroperoxil (HO_2), hidroxila (OH) e superóxido (O_2^-). Sua reatividade é atribuída ao grande poder de oxidação desses radicais (KIM; YOUSEF; DAVE, 1999). Quando reage com compostos orgânicos pode formar aldeídos, cetonas ou ácidos carboxílicos que não representam risco à saúde (PASCUAL; LLORCA; CANUT, 2007; TIWARI *et al.* 2010).

Devido ao seu poder oxidante, tem sido investigado como um agente antimicrobiano: tanto pela molécula triatômica quanto pelos radicais formados durante a sua dissociação (CROWE *et al.*, 2012). Desperta interesse devido a sua grande eficácia

biocida, amplo espectro antimicrobiano, meia-vida curta (20 a 30 min a 20°C), ausência de subprodutos que são prejudiciais à saúde e a capacidade de geração sob demanda "in situ", não necessitando armazenagem anterior ao uso (PASCUAL; LLORCA; CANUT, 2007; DOSTI; GUZEL-SEYDIM; GREENE, 2005; KHADRE; YOUSEF; KIM, 2001). Porém, o efeito bactericida do ozônio pode ser afetado por inúmeros fatores: condições ambientais, população microbiana, presença de matéria orgânica e forma de aplicação (KIM; YOUSEF; CHISM, 1999).

Temperatura, pH e umidade são importantes fatores ambientais que influenciam sua ação. O aumento da temperatura e do pH afeta a solubilidade, estabilidade e reatividade do gás, tornando o ozônio menos solúvel e menos estável. Sendo assim, baixos pH e temperatura favorecem a ação direta da molécula de ozônio, devido ao aumento da sua estabilidade; ao passo que pH e temperatura altos favorecem a inativação em virtude da maior indução de radicais livres (FAN *et al.*, 2012; KHADRE; YOUSEF; KIM, 2001). Estudos demonstram que baixas temperaturas têm efeito sinérgico com o ozônio, devido ao aumento de sua estabilidade (PALOU *et al.*, 2002). Além desses fatores, observam-se melhores resultados na redução de microrganismos quando o ozônio é aplicado em atmosferas mais úmidas. Braun, Fernandez e Fuhrmann (2011) testaram a habilidade do ozônio em reduzir *Salmonella* Enteritidis de ovos em ambientes com 70 e 30% de umidade e observaram que o ambiente com 70% de umidade propiciou maior redução de bactérias.

Um número elevado de bactérias presentes em líquido submetido ao tratamento com ozônio pode impossibilitar sua ação, pois os restos de células que vão sendo inativadas podem proteger as bactérias ainda vivas do contato com o gás. Estudos com ozônio em solução aquosa sugerem que 10^6 UFC/mL são suficientes para formar uma camada de proteção sobre as células viáveis (FINCH; SMITH; STILES, 1988; THANONSUB *et al.*, 2002).

A presença de compostos orgânicos pode aumentar a demanda de ozônio e reduzir sua disponibilidade para eliminar os microrganismos (KHADRE; YOUSEF; KIM, 2001; KIM; YOUSEF; CHISM, 1999). Restaino *et al.* (1995) comparando a eficácia antimicrobiana de solução aquosa de ozônio na presença de amido solúvel e soro-albumina bovina, demonstraram que o tipo de matéria orgânica influencia a ação do ozônio mais do que a sua quantidade no alimento.

O ozônio pode ser utilizado em forma de gás ou dissolvido em água (forma aquosa) e para muitos microrganismos patogênicos e deteriorantes é necessário um

tempo e concentração mínima de ozonização que resultará na inativação desejada ou em aumento da fase lag dos microrganismos (GUJER; VON GUNTEN, 2003). Entretanto, níveis de concentração e duração acima dos ideais podem resultar em dano ao alimento ou ao ambiente (CÁRDENAS *et al.*, 2011; RICE; GRAHAM, 2001). Diante disso, é necessário fazer a distinção entre a concentração do ozônio aplicado e o ozônio residual, que será detectado após o não contato com a superfície alvo. Tanto a instabilidade sob certas condições, quanto a presença de substâncias que o consomem, afetam o nível de ozônio residual disponível, que deve ser monitorado durante a aplicação (PASCUAL; LLORCA; CANUT, 2007).

2.3.2 Efeito do ozônio em bactérias

O ozônio lesa os microrganismos pela progressiva oxidação de componentes vitais da célula. Nas bactérias, seu principal alvo é a membrana, porém a exposição prolongada afeta também outros componentes intracelulares (THANOMSUB *et al.*, 2002). Na membrana bacteriana o ozônio atinge, principalmente, as glicoproteínas e os glicolípídeos, resultando na alteração da permeabilidade e lise da célula. Age também sobre aminoácidos, peptídeos, proteínas, ácidos graxos poliinsaturados e os grupos sulfidríla de enzimas (KHADRE; YOUSEF, 2001; ZEYNEP; GREENE; SEYDIM, 2004).

Os microrganismos não possuem resistência intrínseca ao ozônio, porém a suscetibilidade ao tratamento pode ser variável (KIM; YOUSEF; CHISM, 1999). Há controvérsia quanto à suscetibilidade de bactérias Gram positivas e negativas ao ozônio. Alguns autores afirmam que Gram positivas são mais suscetíveis, enquanto outros afirmam que o ozônio é mais eficaz contra Gram negativas (ALWI; ALI, 2014; KIM; YOUSEF, 2000; MOORE *et al.*, 2000; PASCUAL; LLORCA; CANUT, 2007). Entretanto, há consenso que bactérias são mais suscetíveis que leveduras e fungos, e que os esporos bacterianos são mais resistentes do que as células vegetativas (PASCUAL; LLORCA; CANUT, 2007).

Restaino *et al.* (1995) investigaram o efeito antimicrobiano do ozônio contra bactérias isoladas de alimentos e determinaram que tanto bactérias Gram positivas (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*) como Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Yersinia enterocolitica*) eram destruídas. Em outro estudo, determinou-se que *Escherichia coli* 0157:H7 era o

microrganismo mais resistente, seguido de *Pseudomonas fluorescens*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Listeria monocytogenes* (KIM; YOUSEF, 2000). Em relação aos esporos bacterianos, Khadre e Yousef (2001) observaram que o gás foi efetivo para as espécies de *Bacillus* testadas.

2.3.3 Utilização do ozônio na indústria de alimentos

O ozônio é um desinfetante com grande potencial de utilização na indústria de alimentos, podendo ser adotado para redução de biofilme, higienização de equipamentos, reutilização de águas residuais e diretamente nos alimentos. Nos Estados Unidos, sua utilização em águas engarrafadas é permitida desde 1982; e, desde 1997, na reciclagem de água de resfriamento de abatedouro de aves (ZEYNEP; BEVER; GREENE, 2004; RICE; GRAHAM, 2001). Em 2001, foi aprovado como agente antimicrobiano permitido para aplicação direta em alimentos, tanto sob forma de gás como em solução aquosa (FDA, 2001). Desta forma, a aplicação de ozônio em frutas, produtos vegetais e produtos cárneos tem sido testada para inativação de patógenos e microrganismos deteriorantes (ACHEN; YOUSEF, 2001; AKBAS; ÖZDEMIR, 2008; BIALKA; DEMIRCI, 2007; CULLEN *et al.*, 2009).

Estudos têm comparado a eficácia de diversas formas de aplicação do ozônio. Biofilmes de *Pseudomonas* sp. em superfície inoxidável tratados com solução aquosa de 0,6 ppm de ozônio durante dez minutos, apresentaram redução de 4,2 log UFC de bactérias (DOSTI; GUZEL-SEYDIM; GREENE, 2005). Dois métodos de aplicação de ozônio foram testados em higienização comercial de maçãs contaminadas com *E. coli* O157:H7: imersão em água com ozônio (22 a 24 mg/L) e lavagem em água borbulhante com ozônio (21, 25 e 28 mg/L). O melhor desempenho foi alcançado com a lavagem com água borbulhante durante três minutos, havendo redução de 3,7 log UFC/g (ACHEN; YOUSEF, 2001). Estudos que utilizam pressão ou líquido em movimento sugerem maior efeito antimicrobiano do ozônio, pois partículas orgânicas são removidas e as bactérias sofrem alguma ação mecânica (KIM; YOUSEF; KHADRE, 2003). A forma gasosa e a forma aquosa de ozônio foram comparadas na eliminação de *Salmonella* sp. e *E. coli* O157:H7 em mirtilos. O tratamento na forma aquosa mostrou ser mais eficaz, alcançando reduções de 6,2 e 5,2 log UFC/g de *Salmonella* sp. e *E. coli* O157:H7, respectivamente. Além disso, o tratamento aquoso não causou escurecimento da fruta (BIALKA; DEMIRCI, 2007).

2.3.3.1 Tratamento com ozônio em produtos cárneos

A aplicação do ozônio em carne bovina, de aves e espécies marinhas foi mais relatada do que na carne suína (BOLDER, 1997; CAMPOS *et al.*, 2005; CÁRDENAS *et al.*, 2011; CORTESI *et al.*, 2011). No entanto, concentrações eficazes do gás para tratamento desses alimentos ainda não são estabelecidas, pois os estudos conduzidos apresentam variação nas condições de aplicação (tempo, temperatura, concentração), nas características dos alimentos testados, nos ambientes e nas populações microbianas (CROWE, 2012). O uso excessivo de ozônio pode resultar em oxidação, descoloração e alteração do sabor do alimento (KIM; YOUSEF; DAVE, 1999). Diante disso, pesquisas também devem considerar os parâmetros químicos e sensoriais do alimento ao selecionar o método de aplicação do ozônio (CROWE *et al.*, 2012).

Diversos estudos relatam a aplicação de ozônio em carne bovina. Carcaças bovinas submetidas a 0,03 ppm de ozônio gasoso, durante nove dias (95% de umidade e 1,6°C de temperatura), apresentaram inibição do crescimento bacteriano, bem como um maior escurecimento da carcaça (GREER; JONES, 1989). A água com ozônio (0,5%) aplicada no tecido adiposo bovino demonstrou ser mais eficaz na redução de microrganismos do que o ácido acético (2%), fosfato trissódico (12%) e desinfetante comercial (0,3%) (GORMAN *et al.*, 1995). Ao contrário, Reagan *et al.* (1996) utilizaram 0,3 e 2,3 ppm de ozônio na água de lavagem de carcaças bovinas e não obtiveram diferença nas contagens microbianas, quando comparada à lavagem convencional. Estudos mais recentes em carne bovina, relataram que o uso de 72 ppm de ozônio gasoso, durante 24 horas, diminuiu dois ciclos logarítmicos na contagem de mesófilos aeróbios totais, porém causou dano na coloração e oxidação lipídica da carne. Contudo, a aplicação dessa mesma concentração, por três horas, foi capaz de reduzir 0,5 log UFC de mesófilos e manteve inalteradas as propriedades organolépticas (CÁRDENAS *et al.*, 2011).

Em aves, o ozônio aplicado na água de resfriamento de carcaças eliminou 99% dos microrganismos presentes, sem oxidação lipídica significativa, desenvolvimento de aroma indesejado ou perda da cor da pele da carcaça (SHELDON; BROWN, 1986). Cortesi *et al.* (2011) evidenciaram que a aplicação de baixa concentração de ozônio (0,4 ppm), em carcaças da mesma espécie, durante 14 dias, aumentava a vida de prateleira e não alterava as características organolépticas. Por outro lado, a aplicação de alta concentração de ozônio (2000 ppm) por menor tempo (30 minutos) também

propiciaram redução de 97% *Salmonella* Infantis e 95% *Pseudomonas aeruginosa* em pele de frango refrigerada (AL-HADDAD; QASSEMI; ROBINSON, 2005).

O armazenamento de sardinha em gelo adicionado de 0,17 ppm de ozônio melhorou sua qualidade sensorial, microbiológica e bioquímica comparado ao armazenamento convencional (CAMPOS *et al.*, 2005). Mexilhões sem a concha embalados a vácuo foram submetidos a 1 ppm de ozônio em solução aquosa por 60 e 90 minutos, sendo observado redução de até 2,5 log UFC/g de bactérias em relação ao controle e aumento de três dias de vida de prateleira (MANOUSARIDIS *et al.*, 2005). Da mesma forma, pulverizações de solução aquosa de 1,5 ppm de ozônio em filetes de salmão, armazenados a 4°C, demonstraram eficácia na redução da contagem de bactérias aeróbias e redução significativa da contagem de *L. innocua* sem causar aumento nos níveis de oxidação lipídica (CROWE *et al.*, 2012).

A aplicação do ozônio em carcaças suínas é pouco relatada, tendo sido mais estudada em seus produtos derivados. Estudo realizado com costeletas suínas submetidas à aplicação de 100 ppm e 1000 ppm de ozônio, durante 10 e 30 minutos, demonstrou redução nos compostos orgânicos voláteis, indicando a eficácia do ozônio em reduzir o metabolismo dos microrganismos, aumentando a vida de prateleira (JAKSCH *et al.*, 2004). A lavagem de tripas suínas com solução aquosa de 7 ppm de ozônio, durante uma e duas horas, reduziu 0,4 e 0,6 log UFC/25,4 cm de *E. coli*, respectivamente. O aumento do tempo de tratamento para quatro horas causou danos à matéria prima. (BENLI *et al.*, 2008). O sinergismo da utilização do ozônio com lactato de potássio contra *Salmonella* Typhimurium pode ser observado na aplicação de ambos em carne suína (PIACHIN; TRACHOO, 2011).

2.3.3.2 Oxidação

Um dos principais fatores que limitam a qualidade e aceitabilidade da carne e seus derivados é a oxidação lipídica (MORRISSEY *et al.*, 1998). Produtos cárneos são naturalmente predispostos à oxidação, pois possuem altas concentrações de catalisadores oxidativos (ferro e mioglobina) e lipídeos insaturados (DECKER *et al.*, 1993). O ozônio possui poder oxidante e, por isso, consegue eliminar os microrganismos; porém também pode oxidar a matéria orgânica (KIM; YOUSEF; DAVE, 1999; TORLAK; SERT; ULCA, 2013). As reações oxidativas podem alterar a qualidade sensorial (cor, sabor) e nutricional de carnes e seus derivados, produzindo

radicais livres e outros compostos oxidados, os quais não são perigosos à saúde (CÁRDENAS *et al.*, 2011; MORRISSEY *et al.*, 1998; VENTANAS *et al.*, 2006). Sabendo que a oxidação lipídica é uma das principais causas de deterioração em carnes e que o ozônio pode ser fator importante para que ela ocorra, é necessário determinar a ocorrência de oxidação após a sua aplicação a fim de garantir as propriedades organolépticas do alimento (DECKER *et al.*, 1993; JO; AHN, 1998).

Considerando que a ozonização exige um equipamento específico, o desempenho do tratamento na diminuição das contagens microbianas e também na qualidade da carne deve ser investigado de modo a justificar o investimento necessário (CÁRDENAS *et al.*, 2011).

2.3.4 Os riscos da utilização do ozônio

É importante controlar o contato com o ozônio de trabalhadores da indústria, pois existe um tempo e concentração limite aceitável para exposição ao ozônio (ZEYNEP; GREENE; SEYDIM, 2004). O limite estabelecido à concentração de 0,1 ppm é de até oito horas, enquanto os humanos podem ser expostos à concentração de 0,3 ppm por até três períodos diários de 15 minutos (RICE; GRAHAM, 2001). Quando em contato com doses além das permitidas, o ozônio causa irritação nos olhos e na garganta, tosse e tontura (ZEYNEP; GREENE; SEYDIM, 2004). Portanto, os aspectos relativos à segurança ocupacional devem ser levados em conta ao estabelecer um protocolo de tratamento com ozônio na indústria de alimentos (RICE; GRAHAM, 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Determinação da concentração de uso do ozônio

Duas concentrações de ozônio (5 e 7 ppm) foram aplicadas por duas horas em um sistema em pequena escala. O ozônio foi gerado por um aparelho (Alvap®) com produção do gás por efeito corona em caixa isotérmica fechada (40 x 50 x 90 cm) com comunicação exterior para captação de oxigênio do ambiente. As concentrações desejadas foram atingidas em uma hora e monitoradas durante as duas horas de aplicação por um sensor portátil (Eco Sensor®) acoplado à caixa.

Fragmentos (30cm por 15cm) de pele suína foram imersos em uma suspensão de *Staphylococcus* coagulase negativa (proveniente da bacterioteca do Laboratório de Medicina Veterinária - UFRGS) em concentração final de aproximadamente 10^4 Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL). Após 15 minutos de imersão, os fragmentos de pele foram acondicionados em recipientes estéreis por igual período de tempo. Cinco fragmentos de pele artificialmente contaminados foram submetidos a cada uma das concentrações de ozônio e amostrados individualmente por meio de esponjas de celulose estéreis (2,5cm por 2,5cm) friccionadas em área (25 cm^2) delimitada por moldes estéreis. A coleta de amostra foi realizada em áreas contíguas do fragmento de pele em dois tempos: antes e logo após a realização do tratamento com ozônio. Imediatamente após a colheita, as esponjas foram colocadas, individualmente, em 25 mL de Água Peptonada (AP) 0,1% e submetidas a diluições seriadas e contagem de mesófilos aeróbios totais.

3.2 Aplicação de ozônio em carcaças suínas durante o período de resfriamento

O experimento foi conduzido em um matadouro-frigorífico sob Serviço de Inspeção Federal, localizado no estado do Rio Grande do Sul. Foram conduzidos cinco blocos consecutivos, com intervalo mensal, que incluíram dois tratamentos: grupo controle (T1) constituído por oito carcaças suínas processadas num único turno de abate e submetidas ao resfriamento (16 horas a 3°C); grupo tratamento (T2) oito carcaças suínas processadas no mesmo turno de abate e submetidas a dois períodos de quatro horas de aplicação de até 5ppm de ozônio durante o período de resfriamento (16 horas a

3°C). Os grupos T1 e T2 foram alocados em câmaras frias distintas com capacidade para 600 e 280 carcaças, respectivamente.

Para geração de ozônio foi utilizado um equipamento comercial (Alvap®) com produção de ozônio através do efeito corona e alimentador de gás oxigênio artificial. O período de emissão do gás foi controlado por um cronômetro acoplado ao aparelho e a concentração monitorada por um sensor portátil (Eco Sensor®) no intervalo de 0 a 5 ppm. A aplicação do ozônio foi iniciada logo após o fechamento da câmara fria, por um período de quatro horas, quando era atingida a concentração de 5 ppm no interior da mesma, e novamente aplicado após seis horas.

Cada carcaça alocada em cada um dos grupos de tratamento foi amostrada antes (meia carcaça direita) e após o período de 16 horas de resfriamento (meia carcaça esquerda). Em cada amostragem, duas esponjas estéreis (Nasco®), previamente umedecidas em AP 0,1% (10 mL/esponja), foram friccionadas na superfície de quatro áreas da carcaça (lombo, papada, pernil e barriga), delimitadas por moldes estéreis de 100 cm², totalizando 400 cm² (BRASIL, 2007). Após a coleta, as esponjas foram acondicionadas em sacos estéreis e mantidas em caixa isotérmica até o processamento.

Em cada amostra foi adicionado 30 mL de AP 0,1%, totalizando 50 mL de amostra. Dessa forma, cada mililitro da solução correspondeu a oito centímetros de área de carcaça amostrada. As amostras foram homogeneizadas por 60 segundos (Food Samples Homogenizers, Logen Scientific) e submetidas à contagem de mesófilos aeróbios totais e *Escherichia coli*, bem como pesquisa dos gêneros *Salmonella* e *Listeria*.

3.3 Análise microbiológica

3.3.1 Contagem de mesófilos aeróbios totais e *Escherichia coli*

Cada amostra foi submetida a diluições decimais seriadas (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) em solução salina 0,85% estéril. Alíquotas de 1 mL foram pipetadas, em duplicata, em placas de Petri estéreis para realização da técnica de semeadura em profundidade para enumeração de bactérias. Para mesófilos aeróbios totais, seguiu-se a metodologia descrita por Morton (2001) com a utilização do Ágar Contagem em Placa (PCA, Himedia®), enquanto que o Ágar Cromogênico para Coliformes (Chromocult Coliform, Merck®) foi empregado para contagem de *Escherichia coli*. Colônias características

foram contadas após 48 horas de incubação a $36\pm 1^\circ\text{C}$. A média das contagens foi multiplicada pelo inverso da diluição, obtendo-se o valor em Unidade Formadora de Colônia (UFC) por mililitro. A cepa *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada para controle dos meios de cultura.

3.3.2 Pesquisa de *Salmonella* sp.

De cada amostra, 25 mL da suspensão foram adicionados a 225 mL de AP tamponada 1% estéril e incubados durante 18 horas a $36\pm 1^\circ\text{C}$ para um pré-enriquecimento inicial. Alíquotas de 1 mL e 0,1 mL foram adicionadas em 9 mL de Caldo Tetrionato Müller-Kauffmann (Merck®) e em 9,9 mL de Caldo Rappaport-Vassiliadis (Oxoid®), respectivamente, como enriquecimento seletivo. Os caldos foram incubados em banho de água por 24 horas a $41\pm 1^\circ\text{C}$. Ágar Xilose-Lisina Desoxicolato (Difco®) e ágar Verde Brilhante (Micro Med®) foram utilizados como meio seletivo e diferencial para isolamento e incubados durante 48 horas a $36\pm 1^\circ\text{C}$. Após repique de colônias características de ambos os meios em Ágar Triptona de Soja (TSA, Oxoid®) (24 horas/ $36\pm 1^\circ\text{C}$), a identificação foi realizada, seguindo ISO 6579 (2007), por meio dos seguintes testes: produção de gás sulfídrico, indol e motilidade (SIM, Himedia®), crescimento em ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI, Himedia®), urease (Oxoid®), Voges-Proskauer (Himedia®), lisina descarboxilase (Himedia®), β -galactosidase e prova da aglutinação com soro polivalente somático (Probac®). A cepa de *S. Typhimurium* ATCC 14028 foi utilizada para controle dos meios de cultura. Isolados identificados como *Salmonella* sp. foram enviados para sorotipificação na Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

3.3.3 Pesquisa de *Listeria* sp.

Uma alíquota de 1 mL de cada suspensão foi pipetada em 9 mL de caldo Universidade de Vermont (Difco®) para enriquecimento seletivo primário para o gênero *Listeria*. Após incubação de 24 horas em banho de água a $30\pm 1^\circ\text{C}$, foi adicionado 0,1 mL ao segundo caldo de enriquecimento seletivo, caldo Fraser (LB®) e incubado por 48 horas em banho-maria a $35\pm 1^\circ\text{C}$. Ágar *Listeria* segundo Ottaviani e Agosti (Chromocult *Listeria* Merck®) foi utilizado como meio seletivo e diferencial para semeadura. Colônias características, após incubação de 48 horas a $36\pm 1^\circ\text{C}$, foram

repicadas em TSA suplementado com 0,6% de extrato de levedura (Himedia®) (TSA+YE) e incubadas durante 24 horas à $36\pm 1^\circ\text{C}$. Para confirmação do gênero, realizou-se coloração de Gram e testes bioquímicos confirmatórios, segundo Holt *et al.* (1994): catalase, ágar TSI (Himedia®), SIM (Himedia®), redução de nitrato (Vetec®) e fermentação dos açúcares manitol, ramanose e xilose. O teste do CAMP, utilizando *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Rhodococcus equi* (ATCC 6939), foi realizado para confirmação de *Listeria monocytogenes*. A cepa de *L. monocytogenes* ATCC 7644 foi utilizada para controle positivo dos testes.

3.3.4 Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)

Isolados de *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* foram submetidos à macrorrestrrição do DNA total seguida de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE). Foram adotados os protocolos descritos no PulseNet (CDC, 2014b). Os isolados de *Salmonella* sp. foram submetidos à digestão com a enzima XbaI (Thermo Scientific®) enquanto que os isolados de *Listeria monocytogenes* foram clivados com as enzimas AscI (Thermo Scientific®) e ApaI (Thermo Scientific®). A cepa *Salmonella* Braenderup H9812 foi utilizada como marcador de tamanho dos fragmentos gerados. A eletroforese foi realizada no sistema CHEF DR-II (Bio-Rad Laboratories). Após 20 e 19 horas de eletroforese para *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*, respectivamente, os géis foram corados em solução de brometo de etídio ($1\mu\text{g/mL}$) durante 30 minutos, e foto-documentados no sistema Kodak Gel Logic 2200.

Para análise dos perfis de macrorrestrrição foi utilizado o software Gel Compare II v. 6.5 (Applied Maths BVBA, Saint-Martens-Platen, Bélgica). A similaridade entre os perfis foi determinada pelo coeficiente de correlação de Dice. Uma tolerância de 1% na posição das bandas foi adotada para análise do perfil. Foram construídos dendrogramas a partir dos agrupamentos gerados por UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Isolados com uma banda de diferença foram considerados como pertencentes a pulsotipos diferentes.

3.4 Análise estatística

As contagens de mesófilos aeróbios totais foram transformadas para a escala logarítmica. No experimento conduzido para a determinação da concentração de uso do

ozônio, as médias da contagem obtidas em cada grupo foram comparadas pelo Teste t. A análise dos resultados dos tratamentos em carcaças foi realizada pela teoria de modelos mistos para medidas repetidas, considerando os efeitos de tratamento, período de avaliação (como medida repetida), a interação desses dois fatores e quatro tipos de estruturas de matriz de variâncias e covariâncias, usando o PROC MIXED do SAS 2008, conforme Xavier (2000). A estrutura a ser usada na análise foi escolhida com base no menor valor do Critério de Informação de Akaike (AIC). O método de estimação usado foi o de máxima verossimilhança restrita. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p \leq 0,05$.

Devido à baixa contagem de *Escherichia coli*, seus resultados foram analisados como presença ou ausência, assim como planejado para *Salmonella* sp. e *Listeria* sp. Os tratamentos foram comparados dentro dos períodos de avaliação utilizando o teste Exato de Fisher. Para comparar os períodos dentro de cada tratamento, foi utilizado o teste do sinal, tratando-se de dados pareados não paramétricos. Para consecução do teste foi criada uma variável auxiliar baseada na diferença entre antes e depois, sendo considerado o valor um para presença da bactéria no período depois; zero quando presença da bactéria no período antes e ausência no período depois. Um teste binomial foi aplicado para avaliar a proporção de zeros. Os dados com ausência da bactéria nos dois períodos não foram considerados nessa análise, pois não eram informativos para as conclusões. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

A contaminação artificial de fragmentos de pele de suíno resultou em uma contagem média de 4,03 log UFC/cm² de mesófilos aeróbios totais na amostra colhida antes do tratamento com ozônio. A aplicação de 5 e 7 ppm de ozônio, durante duas horas, apresentou redução significativa ($p < 0,05$) de 1,1 log UFC/cm² e 1,03 log UFC/cm², respectivamente, nas referidas contagens, sem diferença significativa ($p > 0,05$) entre as concentrações.

A partir desse resultado, foi adotada a concentração de 5 ppm para a aplicação no experimento conduzido em carcaças. No matadouro frigorífico, a capacidade do gerador de ozônio, em relação ao tamanho da câmara fria, determinou que fosse necessário um período de quatro horas para que a concentração de 5 ppm fosse atingida (Apêndice A).

As carcaças amostradas antes do período de resfriamento apresentaram contagem de mesófilos aeróbios totais que variaram de 1,39 log UFC/cm² a 3,66 log UFC/cm² (Apêndice B), sem diferença significativa ($p > 0,05$) entre as médias dos grupos controle (T1) e tratamento (T2) antes do resfriamento (Tabela 1). No grupo T1, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na contagem de mesófilos aeróbios totais obtidos antes e após o período de resfriamento das carcaças (Tabela 1). Ao contrário, no grupo T2, o tratamento com dois ciclos de aplicação de 5 ppm de ozônio nas carcaças armazenadas na câmara fria resultou em decréscimo significativo de mesófilos aeróbios totais, alcançando redução de 0,38 log UFC/mL.

Tabela 1. Médias e erro-padrão da contagem de mesófilos aeróbios totais transformada em logaritmo na base 10, em carcaças amostradas antes e após 16 horas de resfriamento em grupo de carcaças tratadas com dois ciclos de aplicação de ozônio até 5 ppm (T2) e grupo controle (T1).

Período	Grupo		Pr>F
	T1 Log UFC/mL	T2 Log UFC/mL	
Antes do resfriamento	3,29±0,08 ^A	3,36±0,08 ^A	0,5523
Depois do resfriamento	3,44±0,06 ^A	2,98±0,06 ^B	<0,0001
Pr>F	0,1198	0,0002	

Letras diferentes indicam resultados com diferença significativa ($p < 0,05$).

A contagem em 1 mililitro (mL) equivale a 8cm² de área amostrada em carcaça.

Em relação à *E. coli* e *Salmonella* sp. houve aumento significativo ($p < 0,05$) no número de carcaças positivas no grupo T1 após o resfriamento (Tabela 2 e 3). No grupo T2, o número de carcaças positivas para *E. coli* e *Salmonella* sp. não diferiu significativamente nos dois tempos observados.

Tabela 2. Percentual de carcaças positivas para *Escherichia coli* antes e após 16 horas de resfriamento em grupo de carcaças tratadas com dois ciclos de aplicação até 5 ppm (T2) e grupo controle (T1).

Período	Grupo		Pr \leq P
	T1**	T2**	
Antes do resfriamento	56,25 (18/32) ^A	35,48 (11/31*) ^A	0,1313
Depois do resfriamento	62,50 (20/32) ^B	22,58 (7/31*) ^A	0,0021
Pr $>$ Z	0,0060	0,7963	

Pr \leq P = nível descritivo de probabilidade do teste Exato de Fisher; Pr $>$ |Z| = nível descritivo de probabilidade do teste do sinal.

Letras diferentes indicam resultados com diferença significativa ($p < 0,05$).

*Uma carcaça do grupo tratamento foi excluída do experimento.

** No primeiro bloco de tratamento não foi determinada a presença de *E. coli*

Tabela 3. Percentual de carcaças positivas para *Salmonella* sp. antes e após 16 horas de resfriamento em grupo de carcaças tratadas com dois ciclos de aplicação até 5 ppm (T2) e grupo controle (T1).

Período	Grupo		Pr \leq P
	T1	T2	
Antes do resfriamento	15,00 (6/40) ^A	7,69 (3/39*) ^A	0,4814
Depois do resfriamento	27,50 (11/40) ^B	0,00 (0/39*) ^A	<0,0001
Pr $>$ Z	0,0126	0,0823	

Pr \leq P = nível descritivo de probabilidade do teste Exato de Fisher; Pr $>$ |Z| = nível descritivo de probabilidade do teste do sinal.

Letras diferentes indicam resultados com diferença significativa ($p < 0,05$).

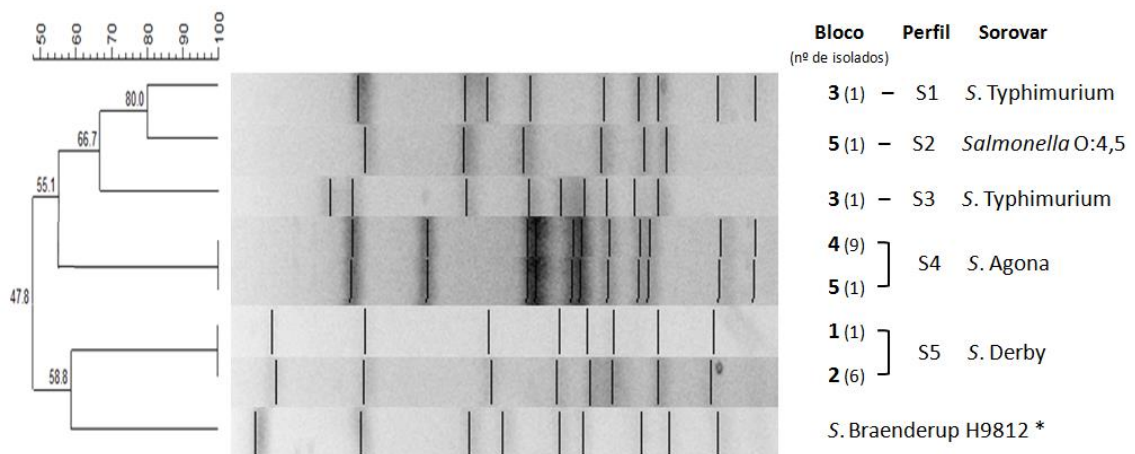
*Uma carcaça do grupo tratamento foi excluída do experimento.

Os 20 isolados de *Salmonella* sp. foram identificados como pertencentes aos seguintes sorovares: *S. Derby* (7), *S. Typhimurium* (2), *S. Agona* (10) e *S. enterica*

subsp. *enterica* (O:4,5) (1). Todos os sorovares, exceto *S. enterica* subsp. *enterica* (O:4,5), foram encontrados tanto no grupo T1 quanto no T2.

O perfil de PFGE de todos isolados de *Salmonella* sp. revelou cinco pulsotipos (Figura 2). Os perfis apresentaram entre seis e 11 bandas com tamanho entre 1135 e 138 kb. Todos os isolados pertencentes a um mesmo sorovar foram agrupados em um único pulsotipo, exceto *S. Typhimurium* que apresentou dois perfis distintos. Pulsotipos de *S. Agona* e *S. Derby* foram encontrados em carcaças distintas pertencentes ao mesmo bloco do grupo T1 antes e após o resfriamento.

Figura 2. Perfis de PFGE de isolados de *Salmonella* sp. clivados com XbaI.



Fonte: o próprio autor

*Marcador de peso molecular *Salmonella* Braenderup H9812.

Em relação à *Listeria* sp. não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos e períodos (antes e após o resfriamento) (Tabela 4). Duas espécies do gênero *Listeria* foram identificadas: *L. innocua* (n=5) e *L. monocytogenes* (n=10). Três pulsotipos (Figura 3) foram identificados entre os isolados de *L. monocytogenes*. Os perfis obtidos após a clivagem com cada uma das enzimas apresentaram de 7 a 9 bandas de tamanho entre 1135 a 78,2 kb. O pulsotipo L3, que incluiu oito isolados, foi identificado em carcaças do grupo T1 amostradas antes e após o resfriamento.

Tabela 4. Percentual de carcaças positivas para *Listeria* sp. antes e após 16 horas de resfriamento em grupo de carcaças tratadas com dois ciclos de aplicação até 5 ppm (T2) e grupo controle (T1).

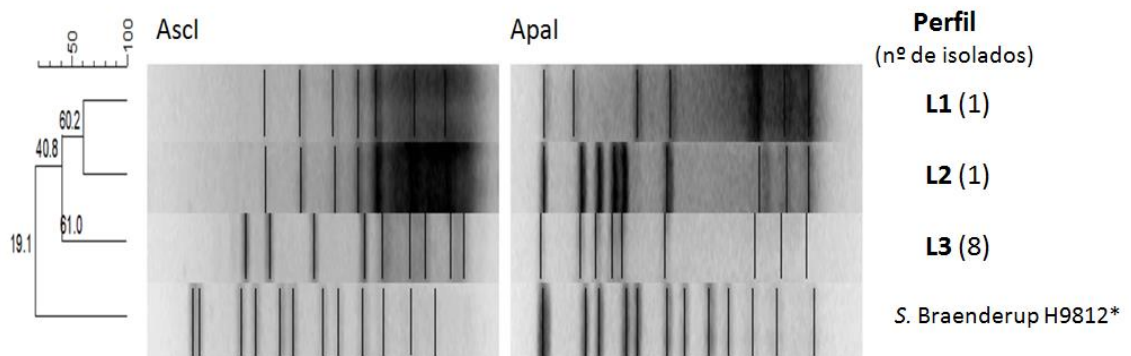
Período	Grupo		Pr≤P
	T1	T2	
Antes do resfriamento	17,50 (7/40) ^A	5,13 (2/39*) ^A	0,1543
Depois do resfriamento	10,26 (4/40) ^A	5,13 (2/39*) ^A	0,6748
Pr> Z	1,000	1,000	

Pr≤P = nível descritivo de probabilidade do teste Exato de Fisher; Pr> |Z| = nível descritivo de probabilidade do teste do sinal.

Letras diferentes indicam resultados com diferença significativa (p<0,05).

*Uma carcaça foi excluída do experimento.

Figura 3. Perfis de PFGE de isolados de *Listeria monocytogenes* clivados com AscI e ApaI.



Fonte: o próprio autor

*Marcador de peso molecular *Salmonella* Braenderup H9812 digerida com a enzima XbaI

5 DISCUSSÃO

A inocuidade dos produtos suínos depende da boa qualidade do processo de abate e da elaboração de seus produtos. As contagens bacterianas na superfície das carcaças variam consideravelmente dentro do matadouro, uma vez que algumas etapas no abate são fundamentais para sua redução, outras favorecem a contaminação cruzada (BOLDER, 1997). A qualidade do processo depende de programas como BPF e APPCC, cuja eficácia pode ser monitorada por indicadores microbiológicos. Considerando isto, o matadouro-frigorífico onde o experimento foi conduzido apresentou indicadores compatíveis com um processo controlado, visto que a média de mesófilos aeróbios totais não ultrapassou 3 ciclos logarítmicos (BRASIL, 2007) e houve baixa frequência de isolamento de *E. coli* nas carcaças. Mesmo assim, *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* foram encontradas em todos os blocos de observação, indicando que, mesmo em processos controlados, pode ser difícil a eliminação completa de agentes patogênicos sem a adoção de medidas de descontaminação pós-processamento (HUFFMAN, 2002). Dessa forma, a indústria de alimentos tem buscado alternativas que eliminem os patógenos e que sejam de aplicação segura (AYMERICH; PICOUET; MONFORT, 2008; HUGAS; TSIGARIDA, 2008).

O resfriamento após o processo de abate é uma etapa fundamental para controle dos microrganismos, pois diminui a taxa metabólica inibindo a multiplicação bacteriana (USDA, 1999). Embora estudos indiquem que métodos de resfriamento rápido possam reduzir a contaminação nas carcaças, em virtude da perda de umidade superficial que ocasionam (BORCH; NESBAKKEN; CHRISTENSEN, 1996; GILL *et al.*, 2000), nossos resultados demonstraram que o resfriamento convencional não influenciou o número de mesófilos aeróbios totais e *Listeria* sp. na superfície das carcaças no grupo submetido apenas ao resfriamento (T1). Em relação à *E. coli* e *Salmonella* sp. houve, inclusive, aumento significativo de carcaças positivas nesse grupo, demonstrando que o armazenamento na câmara fria não reduziu a presença dessas bactérias e, provavelmente, propiciou a contaminação cruzada entre carcaças. A identificação dos mesmos pulsotipos de *S. Derby* e *S. Agona* antes e após o resfriamento, bem como em carcaças distintas após o armazenamento, suportam essa hipótese.

A aplicação do ozônio nas carcaças do presente estudo reduziu mesófilos aeróbios totais ($p < 0,05$), apesar de não ter propiciado redução significativa no número

de carcaças positivas para *E. coli*, *Salmonella* sp. e *Listeria* sp. O tratamento com ozônio apresenta características que são desejáveis em um sanitizante para a indústria de alimentos: possui alta reatividade; decompõem-se espontaneamente em produtos atóxicos ou em oxigênio; minimiza o acúmulo de resíduos inorgânicos no ambiente; e provoca morte bacteriana rapidamente, por alterar a permeabilidade celular. Além disso, sua eficácia já foi demonstrada em diversos alimentos (KIM; YOUSEF; DAVE, 1999, TRINDADE *et al.*, 2012). Entretanto, a comparação de resultados obtidos em diferentes estudos pode ser difícil, devido à diversidade dos tratamentos adotados (gás ou solução aquosa), concentrações e tempo de exposição (CORTESI *et al.*, 2011). A redução inferior a um ciclo logarítmico de mesófilos aeróbios totais em nosso estudo corroborou com a baixa redução observada em tratamentos realizados em produtos cárneos (CÁRDENAS *et al.*, 2011; STIVARIUS *et al.*, 2002). Bolder *et al.* (1997) consideraram baixa a redução (<1log) obtida por Sheldon; Brown (1986) para contagens de mesófilos aeróbios e psicotróficos em carcaças de frango resfriadas com ozônio em solução aquosa. No presente estudo, a aplicação de ozônio em pequena escala permitiu reduzir um ciclo logarítmico. Contudo, a aplicação de tratamentos antimicrobianos costuma ser mais eficiente em condições controladas de laboratório, uma vez que durante o processo de abate há outros fatores que influenciam a ação das substâncias antimicrobianas (LORETZ; STEPHAN; ZWEIFEL, 2011a). Especificamente em relação à aplicação do ozônio, a adesão de células bacterianas em dobras ou poros da pele de animais abatidos demonstrou ser um fator de proteção contra o contato direto com o gás (AL-HADDAD; QASSEMI; ROBINSON, 2005). No presente estudo, o tamanho da câmara fria e a quantidade de carcaças, resultando em maior teor de matéria orgânica presente, determinaram que houvesse dificuldade em atingir 5 ppm de ozônio. Por esse motivo, o tratamento teve que ser alterado para dois ciclos de aplicação de concentrações crescentes de ozônio, ao invés de duas horas de contato com uma concentração constante do gás. Como consequência, a eficácia da aplicação do ozônio foi prejudicada, como pode ser constatado pela menor redução logarítmica dos mesófilos aeróbios totais.

O tratamento aplicado não reduziu significativamente o número de carcaças positivas para *E. coli* e *Salmonella* sp., apesar de parecer haver uma tendência de redução dessa última ($p = 0,0823$). Por outro lado, foi demonstrado que *Salmonella* Typhimurium é mais resistente do que *E. coli* 0:157 frente ao ozônio, devido ao maior teor de componentes fosfolipídicos da sua membrana celular (ALWI; ALI, 2014).

Considerando isto, a falha em reduzir a presença de *E. coli* nas carcaças, observado no grupo T2 do estudo, não corroboram com a tendência de eficácia do tratamento aplicado em relação à *Salmonella*. Segundo Nieto, Jiménez-Colmenero e Pelsez (1984), o tratamento com ozônio em produtos cárneos seria mais eficaz contra bactérias patogênicas quando aplicado repetidamente, uma vez que haveria o aumento da fase de latência, tornando evidente o efeito destrutivo após quatro dias de aplicação. Da mesma forma, a aplicação ininterrupta de ozônio em carcaças de frango (0,4 ppm, por 60 minutos, durante 14 dias) provou ser capaz de aumentar a vida de prateleira do produto (CORTESI *et al.*, 2011). Entretanto, esses protocolos seriam inexequíveis na rotina de um matadouro-frigorífico, onde as carcaças não permanecem mais do que 24 horas armazenadas.

Apesar de *Listeria sp.* haver sido considerada mais suscetível ao ozônio, aplicado à temperatura de 37°C, quando comparada às Gram negativas (KIM; YOUSEF, 2000; ALWI; ALI 2014), não houve diferença no número de carcaças positivas no grupo tratado do presente estudo. Nieto, Jiménez-Colmenero e Pelsez (1984) afirmaram que a redução de microrganismos resulta da combinação do efeito adverso do ambiente (temperatura) e do efeito letal do ozônio. Levando em consideração que o tratamento foi realizado na câmara fria e que *Listeria sp.* é psicotrófica, os resultados encontrados indicam que o ozônio pode não ser uma opção para o controle dessa bactéria em carcaças resfriadas. Além disso, a sobrevivência de *Listeria monocytogenes* em carcaças fica evidente pela presença do mesmo pulstotipo antes e após o período de resfriamento.

A sensibilidade dos microrganismos ao ozônio pode ser influenciada por muitos fatores, porém a matéria orgânica exerce um papel de destaque. A aplicação em vegetais tem apresentado resultados mais promissores do que em produtos cárneos. A utilização de concentrações de ozônio inferiores as deste estudo (<5 ppm) em vegetais, durante períodos menores (1 a 120 minutos), foi capaz de reduzir aproximadamente 3 log UFC/g de bactérias (NAFAJI; KHODAPARAST, 2009; TORLAK; SERT; ULCA, 2013). Restaino *et al.* (1995) demonstraram que o tipo de matéria orgânica (vegetal e animal) influencia a ação do ozônio de forma crucial. A matéria orgânica animal possui catalisadores oxidativos (ferro e mioglobina) e lipídeos insaturados que predisõem os produtos cárneos à oxidação, reduzindo a ação do ozônio, pois uma parcela do gás é perdida nessa reação. Além disso, a oxidação é responsável por alterações sensoriais

indesejáveis na carne (DECKER *et al.*, 1993; KIM; YOUSEF; DAVE, 1999), sendo a concentração possível de ser utilizada um ponto limitante para aplicação do ozônio.

O tratamento com ozônio em produtos de origem animal demonstrou ser eficaz na redução de *E. coli* e *Listeria* sp. quando aplicado em concentrações elevadas (74 ppm) ou sob forma de solução aquosa (CÁRDENAS *et al.*, 2011; CROWE *et al.*, 2012). Entretanto, o aumento da concentração do gás, para alcançar o efeito antimicrobiano, resultou na alteração de coloração e aumento da oxidação lipídica nos produtos de origem animal tratados (BENLI *et al.*, 2008; CÁRDENAS *et al.*, 2011). O protocolo utilizado no presente estudo não causou oxidação lipídica nas carcaças (dados não mostrados), porém não alcançou redução de bactérias suficiente para justificar o investimento necessário para instalação do sistema na planta de abate. O teste de protocolos que propiciem tempo de contato maior com ozônio a 5 ppm pode ser considerado, porém aspectos importantes como a velocidade de obtenção da concentração de ozônio no interior da câmara fria e os efeitos do maior tempo de exposição para a qualidade da carcaça precisarão ser analisados.

6 CONCLUSÃO

A utilização do gás ozônio em dois ciclos de aplicação de até 5 ppm por quatro horas na câmara fria foi capaz de reduzir significativamente a contagem média de mesófilos aeróbios totais em carcaças suínas. O tratamento não foi eficaz para redução de *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. e *Listeria* sp.

REFERÊNCIAS

- ACHEN, M.; YOUSEF, A. E. Efficacy of ozone against *Escherichia coli* O157:H7 on apples. **Journal of Food Science**. Malden, v. 66, n. 9, p. 1380-1384, Nov. 2001.
- AKBAS, M. Y.; OZDEMIR, M. Application of gaseous ozone to control populations of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* spores in dried figs. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 2, p. 386-391, Apr. 2008.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boas Práticas**: legislação de boas práticas de fabricação. Brasília, [2006?]. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/bpf.htm>>. Acesso em: 07 jan. 2015.
- AL-HADDAD, K. S. H.; QASSEMI, R. A. S.; ROBINSON, R. K. The use of gaseous ozone and gas packaging to control populations of *Salmonella infantis* and *Pseudomonas aeruginosa* on the skin of chicken portions. **Food Control**, v. 16, p. 405-410, 2005.
- ALPIGIANI, I. *et al.*, *Salmonella enterica* prevalence in finishing pigs at slaughter plants in Northern Italy. **Italian Journal of Food Safety**. Itália, v. 3, n. 1609, p. 81-84, 2014.
- ALWI, A. N.; ALI, A. Reduction of *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* sv. Typhimurium populations on fresh-cut bell pepper using gaseous ozone. **Food Control**, v. 46, p. 304-311, 2014.
- ANDERSEN, J. K. Contamination of freshly slaughtered pig carcasses with human pathogenic *Yersinia enterocolitica*. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 7, p. 193-202, 1988.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Brasil**: oferta e demanda de carne suína: 2010 A 2013. São Paulo, 2015a. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/mercado-interno/consumo/Oferta_e_demanda_2013.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2015.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Exportações brasileiras de carne suína**. São Paulo, 2015b. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/mercado-externo/exportacoes/anuais/jan-dez-2014_jan-dez-2013.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2015.
- AYMERICH, T.; PICOUET, P. A.; MONFORT, J. M. Decontamination technologies for meat products. **Meat Science**. Barking, v. 78, p. 114-129, 2008.
- BARCO L. *et al.* Scientific report *Escherichia coli* and *Enterobacteriaceae* counts on pig and ruminant carcasses along the slaughterline, factors influencing the counts and relationship between visual faecal contamination of carcasses and counts: a review. **The EFSA Journal**. Parma, Supporting publication: EN-634. 2014.

- BARROS, M. A. F. *et al.* Identification of main contamination points by hygiene indicator microorganisms in beef processing plants. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 856-862, dez. 2007.
- BENLI, H. *et al.* Biomechanical and microbiological changes in natural hog casings treated with ozone. **Meat Science**. Barking, v. 79, p. 155-162, 2008.
- BERENDS, B. R. *et al.* Identification and quantification of risk factors animal management and transport regarding in *Salmonella* spp. in pigs. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 30, p. 37-53, 1996.
- BERENDS, B. R. *et al.* Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 36, p. 199–206, 1997.
- BIALKA, K. L.; DEMIRCI, A. Decontamination of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on blueberries using ozone and pulsed UV-light. **Journal of Food Science**. Malden, v. 72, n. 9, p. 391-396, Nov. 2007.
- BINTSIS, T.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; ROBINSON, R. K. Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry – a critical review, **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 80, p. 637–645, 2000.
- BOLDER, N. M. Decontamination of meat and poultry carcasses. **Trends in Food Science and Technology**, v. 8, p. 221–227, 1997.
- BOLTON, D. J. *et al.* Washing and chilling as critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point (HACCP) systems. **Journal of Applied Microbiology**. Oxford, v. 92, p. 893-902, 2002.
- BOLTON, D. J.; IVORY, C.; MC DOWELL, D. Thermal inactivation of *Yersinia enterocolitica* in pork slaughter plant scald tank water. **Meat Science**. Barking, v. 95, p. 668-671, 2013.
- BONE, A. *et al.* Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype 4,12:i: infections in France, linked to dried pork sausage, March-May 2010. **Euro Surveillance**. Stockholm, v. 15, n. 24, p. 1-3, Jun. 2010.
- BORCH, E.; NESBAKKEN, T.; CHRISTENSEN, H. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.30, p. 9–25, 1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Decreto nº 30691, de 29 de março de 1952, Aprova o Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 07 jul. 1952. Seção I, p. 10785.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 711, de 1 de novembro de 1995, Aprova as normas técnicas de instalações e equipamentos para abate e industrialização de suínos. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 3 nov. 1995. Seção 1, p.17625.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Circular nº 175 de 16 de maio de 2005. Procedimentos de Verificação dos Programas de Autocontrole. Brasília, DF, 2005. [39 p.]. Disponível em:

<<http://www.fooddesign.com.br/arquivos/legislacao/Circular%20175-05%20PPHO%20para%20frigorifico%20FD.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Circular nº 130 de 13 de fevereiro de 2007. Exportação de carne suína para os Estados Membros da União Europeia. Brasília, DF, 2007. 10p.

BRAUN, P. G.; FERNANDEZ, N.; FUHRMANN, H. Investigations on the effect of ozone as a disinfectant of egg surfaces. **Ozone: Science & Engineering**, v. 33, p. 374–378, 2011.

BUCHER, M. *et al.* Epidemiological data on pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Southern Germany during 2000–2006. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 5, n. 3, p. 273–280. Jun. 2008.

BUCHHOLZ, U. *et al.* An outbreak of *Salmonella* Munchen in Germany associated with raw pork. **Journal of Food Protection**. Ames, v. 68, n. 2, p. 273–276, 2005.

BUNCIC, S. The incidence of *Listeria monocytogenes* in slaughtered animals, in meat and in meat products in Yugoslavia. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 12, n. 2-3, p. 173–180, 1991.

BUNCIC, S.; SOFOS, J. Interventions to control *Salmonella* contamination during poultry, cattle and pig slaughter. **Food Research International**. v. 45. p. 641-655, 2012.

BUTZ, P.; TAUSCHER, B. Emerging technologies: chemical aspects. **Food Research International**. v. 35, p. 279–284, 2002.

CAMPOS, A. *et al.* Effects of storage in ozonised slurry ice on the sensory and microbial quality of sardine (*Sardina pilchardus*). **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 103, p. 121-130. 2005.

CÁRDENAS, F. C. *et al.* Antimicrobial action and effects on beef quality attributes of a gaseous ozone treatment at refrigeration temperatures. **Food Control**. v. 22, n. 8, p. 1442-1447, Aug. 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Estimates of foodborne illness in the United States**, Atlanta, Jan. 2014a. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodborneburden>>. Acesso em: 17 set. 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **PulseNet Pathogens & Protocols: PFGE, protocols**. Atlanta, Dec. 2014b. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/index.html>>. Acesso em: 16 out. 2014

CENTER FOR SCIENCE IN THE PUBLIC INTEREST. **Outbreak alert! 2014: a review of foodborne illness in america from 2002-2011**. Washington, DC, Apr. 2014.

Disponível em: <<http://cspinet.org/reports/outbreakalert2014.pdf>>. Acesso em: 19 set. 2014.

CHANG, V. P.; MILLS, E. W.; CUTTER, C. N. Reduction of Bacteria on Pork Carcasses Associated with Chilling Method. **Journal of Food Protection**. Ames, v. 66, n. 6, p. 1019–1024, Jan. 2003.

CORANTIN, H. *et al.* Effectiveness of steam pasteurization in controlling microbiological hazards of cull cow carcasses in a commercial plant. **The Canadian Journal of Veterinary Research**. v. 69, p. 200–207, 2005.

CORTESI, M. L. *et al.* Decontaminazione mediante ozono di carcasce di pollo refrigerate. Ozone decontamination of chilled poultry carcasses. **Italian Journal of Food Safety**. v. 1, n. 1, p. 51-55, 2011.

CROWE, K. M. *et al.* Application of ozone sprays as a strategy to improve the microbial safety and quality of salmon fillets. **Food Control**. v. 25, n. 2, p. 464-468. June. 2012.

CULLEN, P. J. Modelling approaches to ozone processing of liquid foods. **Trends in Food Science and Technology**. v. 20, n. 3–4, p. 125–136, 2009.

DE BUSSER, E. V. *et al.* *Salmonella* control in live pigs and at slaughter. **The Veterinary Journal**. London, v. 196, n. 1, p. 20-27, Apr. 2013.

DECKER, E. A. *et al.* Chemical, physical, and functional properties of oxidized turkey white muscle myofibrillar proteins. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v. 41, p. 180-189, 1993.

DELHALLE, L. *et al.* Risk factors for *Salmonella* and hygiene indicators in the 10 largest belgian pig slaughterhouses. **Journal of Food Protection**. Ames, v. 71, n. 7, p. 1320–1329, 2008.

DOSTI, B.; GUZEL-SEYDIM, Z.; GREENE A. K. Effectiveness of ozone, heat and chlorine for destroying common food spoilage bacteria in synthetic media and biofilms. **International Journal of Dairy Technology**. v. 58, n. 1, p. 19-24, Feb. 2005.

EGGENBERGER-SOLORZANO, L. *et al.* Hot water and organic acid interventions to control microbiological contamination on hog carcasses during processing. **Journal of Food Protection**. Ames, v. 65, n. 8, p. 1248-1252, 2002.

EPLING, L. K.; CARPENTER, J. A.; BLANKENSHIP, L. C. Prevalence of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. on pork carcasses and the reduction effected by spraying with lactic acid. **Journal of Food Protection**. Ames, v. 56, n. 6, p. 536-537, Jun. 1993.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation n° 1441 of 5 December 2007. On microbiological criteria for foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, Bruxelles, v. 322, p. 12–29, Dec. 2007. Disponível em:

<https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Reg1441_2007%281%29.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2015.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation n° 217 of 7 March 2014. Amending Regulation n° 2073/2005 as regards *Salmonella* in pig carcasses. **Official Journal of the European Union**, Bruxelas, v. 69, p. 93-94. May. 2014. Disponível em: <https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Reg217_2014.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2015

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **Decontamination of carcasses**. Parma, 2014. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/en/topic/decontamination.htm>>. Acesso em: 20 set. 2014.

FAN, X. *et al.* Inactivation of *Listeria innocua*, *Salmonella* Typhimurium, and *Escherichia coli* O157:H7 on surface and stem scar areas of tomatoes using in-package ozonation. **Journal of Food Protection**. Ames, v. 75, n. 9, p. 1611–1618, 2012.

FARZAN, A. *et al.* Occurrence of *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes* in Swine. **Zoonoses and Public Health**. Berlin, v. 57, p. 388–396. 2010.

FEDORKA-CRAY, P. J. *et al.* Transmission of *Salmonella* Typhimurium to swine. **Veterinary Microbiology**. Amsterdam, v. 41, p. 333-344, 1994.

FINCH, G. R.; SMITH, D. W.; STILES, M. E. Dose-response of *Escherichia coli* in ozone demand-free phosphate buffer. **Water Research**. v. 22, n. 12, p. 1563–1570. Dec. 1988.

FLINN D. USDA: U.S. Foodborne Illnesses Cost More Than \$15.6 Billion Annually . **Food Safety News**, Seattle, Oct. 2014. Disponível em: <<http://www.foodsafetynews.com/2014/10/foodborne-illnesses-cost-usa-15-6-billion-annually/#.VMBghNLF8ve>>. Acesso em: 22 jan. 2015

FOLGER, A. T. *et al.* Outbreak of Salmonellosis Associated with Consumption of Pulled Pork at a Church Festival Hamilton County, Ohio, 2010. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. v. 62, n. 51- 52, p. 1045-1047. Jan. 2014

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Pig and...: Pork is the world's most consumed meat from terrestrial animals**. Roma, Dec. 2014.. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/pigs/home.html>>. Acesso em: 18 jan. 2015

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, Department of health and human services. Federal Register n° 3382, of 26 June 2001. Secondary direct food additives permitted in food for human consumption, v. 66, n. 123, Jun. 2001, p. 33829-33830. Disponível em: <<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/062601a.htm>>. Acesso em: 20 set. 2014.

FORSYTHE S. J. Ferramentas de gestão da segurança de alimentos. In:_____. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. cap. 8, p. 375-389.

FOSSE, J.; SEEGER, H.; MAGRAS, C. *et al.* Prevalence and risk factors for bacterial food-borne zoonotic hazards in slaughter pigs: a review. **Zoonoses and Public Health**. Berlin, v. 56, n. 429–454, 2009.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; STOLLE, A.; STEPHAN, R. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pigs slaughtered at a Swiss abattoir. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 119, p. 207–212, 2007.

GHAFIR, Y. *et al.* Hygiene Indicator Microorganisms for Selected Pathogens on Beef, Pork, and Poultry Meats in Belgium. **Journal of Food Protection**. Ames, v. 71, n. 1, p. 35–45, 2008.

GILL, C.O; JONES, T. Assessment of the hygienic characteristics of a process for dressing pasteurized pig carcasses. **Food Microbiology**. London, v.14, p. 81–91, 1997.

GILL, C.O. *et al.* Evaluation of the hygienic performances of the processes for cleaning, dressing, and cooling pig carcasses at eight packing plants. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 58, p. 65–72, 2000.

GIOVANNACCI, I. *et al.* *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants use of RAPD, PFGE and PCR–REA for tracing and molecular epidemiology. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v.53. p. 127–140, 1999.

GORMAN, B. M. *et al.* Evaluation of hand-trimming, various sanitizing agents, and hot water spray-washing as decontamination interventions for beef brisket adipose tissue. **Journal of Food Protection**. Ames, v. 58, p. 899–907, 1995.

GOULET, C. *et al.* Listeriosis outbreak associated with the consumption of rillettes in France in 1993. **The Journal of Infectious Diseases**. Chicago, v. 177, 155–160, Jan. 1998.

GRAHEK-OGDEN, D. *et al.* Outbreak of *Yersinia enterocolitica* Serogroup O:9 Infection and Processed Pork, Norway. **Emerging Infectious Diseases**. Atlanta, v. 13, n. 5, p.754-756, May. 2007.

GREER, G.G; JONES, S. D. M. Effects of Ozone on Beef Carcass Shrinkage, Muscle Quality and Bacterial Spoilage. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**. v. 22, n. 2, p. 156–160, Apr. 1989.

GUIDANCE document on the safety and the efficacy of substances for the removal of microbial surface contamination of foods of animal origin. **The EFSA Journal**. Parma, v. 388, p.1-19. Sep. 2006. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/doc/388.pdf>>. Acesso em: 20 set. 2014.

GUJER, W.; VON GUNTEN, U. A stochastic model of an ozonation reactor. **Water Research**. v. 37, p. 1667–1677, 2003.

HALD, T. A. *et al.* The occurrence and epidemiology of *Salmonella* in European pig slaughterhouses. **Epidemiology Infection**. Cambridge, v.131, p.1187–1203, 2003.

HOLT, J. C. *et al.*, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

HUFFMAN, R. D. Current and future technologies for the decontamination of carcasses and fresh meat. **Meat Science**. Barking, v. 62, p. 285–294, 2002.

HUGAS, M.; TSIGARIDA, E. Pros and cons of carcass decontamination: the role of the European Food Safety Authority. **Meat Science**. Barking, n. 78, p. 43–52, 2008.

HURD, H. S. *et al.* The effect of lairage on *Salmonella* isolation from market swine. **Journal of Food Protection**. Ames, v.64, p.939–944, 2001.

HURD, H. S. *et al.* *Salmonella enterica* infections in market swine with and without transport and holding. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, DC, v.68, p.2376–2381., May. 2002.

HUTCHISON, M. L. *et al.* Implementation of compulsory hazard analysis critical control point system and its effect on concentrations of carcass and environmental surface bacterial indicators in United Kingdom red meat slaughterhouses. **Journal of Food Protection**. Ames, v. 70, n. 7, p. 1633–1639. 2007.

ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. 4 ed. 2002. The international Organization for Standardization, amendment 1: 15 Jul. 2007.

JACQUET *et al.* Investigations related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, DC, v. 61, n. 6, p. 2242–2246. Jun. 1995.

JAKSCH, D. *et al.* The effect of ozone treatment on the microbial contamination of pork meat measured by detecting the emissions using PTR-MS and by enumeration of microorganisms. **International Journal of Mass Spectrometry**. v. 239, p. 209–214, 2004.

JANSEN, A. *et al.* Nation-wide outbreak of *Salmonella* GIVE in Germany. **Zeitschrift für Gastroenterol**. Munchen ,v.43, n.8, p.707–713. Aug. 2005.

JO, C.; AHN, D. U. Fluorometric analysis of 2-thiobarbituric acid reactive substances in turkey. **Poultry Science**. Champaign, v. 77, p. 475–480, 1998.

JONES T. F. *et al.* From pig to pacifier: chitterling-associated yersiniosis outbreak among black infants. **Emerging Infections Diseases**. Atlanta, v. 9, n.8, p.1007-1009. Aug. 2003.

KANUGANTI, S. R. *et al.* Detection of *Listeria monocytogenes* in pigs and pork. **Journal of Food Protection**. Ames, v. 65, n. 9, p. 1470–1474, 2002.

KHADRE, M. A.; YOUSEF, A. E.; KIM, J. G. Microbiological Aspects of Ozone Applications in Food: A Review. **Journal of Food Science**. Malden, v. 66, n. 9, p. 1242-1252, 2001.

- KHADRE, M. A.; YOUSEF, A. E. Sporicidal action of ozone and hydrogen peroxide: A comparative study. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 71, n. 2-3, p. 131–138. 2001.
- KIM, J. G.; YOUSEF, A. E.; CHISM, G. W. Use of ozone to inactivate microorganisms on lettuce. **Journal of Food Safety**, v. 19, p. 17-34, 1999.
- KIM, J. G.; YOUSEF, A. E.; DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: A review. **Journal of Food Protection**. Ames, v. 62, n. 9, p. 1071–1087, 1999.
- KIM, J. G.; YOUSEF, A. E. Inactivation kinetics of foodborne spoilage and pathogenic bacteria by ozone. **Journal of Food Science**. Malden, v. 65, p. 521–528, 2000.
- KIM, J. G.; YOUSEF, A. E.; KHADRE, M. A.. Ozone and its current and future application in the food industry. **Advances in Food and Nutrition Research**. San Diego, v. 45, p. 167–218. 2003
- LADO B. H.; YOUSEF A. E. Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. **Microbes and Infection**. Paris, v. 4, p. 433–440, 2002.
- LANGVAD, B. *et al.* Transmission routes of *Salmonella* Typhimurium DT 104 between 14 cattle and pig herds in Denmark demonstrated by molecular fingerprinting. **Journal of Applied Microbiology**. Oxford, v. 101, p. 883–890, 2006.
- LAUKKANEN, R. *et al.* Transmission of *Yersinia pseudotuberculosis* in the pork production chain from farm to slaughterhouse. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, DC, v. 74, n.17, p. 5444–5450, Sep. 2008.
- LINDBLAD, M.; BERKING, C. A meat control system achieving significant reduction of visible faecal and ingesta contamination of cattle, lamb and swine carcasses at Swedish slaughterhouses. **Food Control**. v. 30, p. 101-105, 2013.
- LO FO WONG, D. M. A. *et al.* Epidemiology and control measures for *Salmonella* in pigs and pork. **Livestock Production Science**. v. 76, p. 215–222. 2002.
- LONCAREVIC S. *et al.* A case of foodborne listeriosis in Sweden. **Letters in Applied Microbiology**. v. 24, p. 64-68, 1997.
- LORETZ, M.; STEPHAN, R.; ZWEIFEL, C. Antibacterial activity of decontamination treatments for cattle hides and beef carcasses. **Food Control**, v. 22, p. 347-359, 2011a.
- LORETZ, M.; STEPHAN, R.; ZWEIFEL, C. Antibacterial activity of decontamination treatments for pig carcasses. **Food Control**. v. 22, p. 1121-1125, 2011b.
- LUDTKE, C. B. *et al.* **Abate Humanitário de Suínos**: Sociedade Mundial de Proteção Animal. Rio de Janeiro. 2010. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/Abate%20H_%20de%20Suinos%20-%20WSPA%20Brasil.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2015.

LUZZI, I. *et al.* An Easter outbreak of *Salmonella* Typhimurium DT 104A associated with traditional pork salami in Italy. **Euro Surveillance**. Stockholm, v. 12, n. 4, p. 149-152, 2007.

MANOUSARIDIS, G. *et al.*, Effect of ozone on microbial, chemical and sensory attributes of shucked mussels. **Food Microbiology**. London, v. 22, p. 1–9, 2005.

MATHAVI, V. *et al.* New trends in food processing, **International Journal of Advances in Engineering & Technology**, v. 5, n. 2, p. 176-187, Jan. 2013.

MILNES, A. S. *et al.* Factors related to the carriage of Verocytotoxigenic *E. coli*, *Salmonella*, thermophilic *Campylobacter* and *Yersinia enterocolitica* in cattle, sheep and pigs at slaughter. **Epidemiology and Infection**, New York, n. 137, p. 1135-48. Aug. 2009.

MOORE, G., GRIFFITH, C., PETERS, A. Bactericidal properties of ozone and its potential application as a terminal disinfectant. **Journal of Food Protection**. Ames, v. 63, n. 8, p. 1100–1106, 2000.

MORILD, R. K.; OLSEN, J. E.; AABO, S. Change in attachment of *Salmonella* Typhimurium, *Yersinia enterocolitica*, and *Listeria monocytogenes* to pork skin and muscle after hot water and lactic acid decontamination. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 145, p. 353–358, 2011.

MORISSEY, P. A. *et al.* Lipid stability in meat and meat products. **Meat Science**. Barking, v. 49, n. 1, p. 73-86, 1998.

MORTON, R. D. Aerobic plate count. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (ed.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4^a ed. American Public Health Association, Washington, D.C, 2001. Cap. 7, p. 63-67.

MURASE, T. *et al.* Fecal excretion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium following a food-borne outbreak. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v.38, n.9, p.3495–3497. Sep. 2000.

MUKHOPADHWAY, S.; RAMASWAMY, R. Application of emerging technologies to control *Salmonella* in foods: a review. **Food Research International**. v. 45, p. 666-677, 2012.

NAJAFI, M. B. H.; KHODAPARAST, M. H. H. Efficacy of ozone to reduce microbial populations in date fruits. **Food Control**. v. 20, p. 27–30, 2009.

NAMVAR, A.; WARRINER, K. Application of enterobacterial repetitive intergenic consensus–polymerase chain reaction to trace the fate of generic *Escherichia coli* within a high capacity pork slaughter line. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 108, p. 155–163, 2006.

NATHUES, C. *et al.* *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica*, and *Salmonella enterica* and their simultaneous occurrence in German fattening pig herds and their

environment. **Journal of Food Protection**. Ames, v. 76, n.10, 2013, p.1704–1711, Oct. 2013.

NAUTA, M. *et al.* Prediction of *Salmonella* carcass contamination by a comparative quantitative analysis of *E. coli* and *Salmonella* during pig slaughter. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 166, p. 231–237, 2013.

NESBAKKEN, T. *et al.* Reduction of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria* spp. on pig carcasses by enclosure of the rectum during slaughter. **International Journal of Food Microbiolog.** Amsterdam, v.23, p.197-208. 1994.

NESBAKKEN, T. *et al.* Occurrence of *Yersinia enterocolitica* and *Campylobacter* spp. in slaughter pigs and consequences for meat inspection, slaughtering, and dressing procedures. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 80, p. 231–240. 2003.

NIELSEN, B.; WEGENER, H. C. Public health and pork and pork products: regional perspectives of Denmark. **Revue Scientifique et Technique**. Paris, v. 16, n. 2, p. 513–524. Aug.1997.

NIETO, J. C.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F.; PELSEZ, M. C. Effect of ozone on bacterial flora in poultry during refrigerated storage. **International Journal of Refrigeration** v. 7, n. 6, Nov. 1984.

NØRRUNG, B.; BUNCIC, S. Microbial safety of meat in the European Union. **Meat Science**. Barking, v. 78, p. 14–24, 2008.

PALOU, L. *et al.* Effects of continuous 0.3 ppm ozone exposure on decay development and physiological responses of peaches and table grapes in cold storage. **Postharvest Biology and Technology**. v. 24, p. 39–48, 2002.

PASCUAL, A.; LLORCA, I.; CANUT, A. Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities. **Trends in Food Science & Technology**. v. 18, p. 29-35, 2007.

PEARCE, R. A. *et al.* Studies to determine the critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point systems. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 90, p. 331– 339, 2004.

PENSABENE, J. W.; FIDDLER, W. Indole and skatole in fresh pork as possible markers of fecal contamination. **Journal of Food Protection**. Ames, v. 59, n. 6, p. 663-665, 1996.

PIACHIN, T; TRACHOO, N. Effect of ozone and potassium lactate on lipid oxidation and survival of *Salmonella* Typhimurium on fresh pork. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. v. 14, n. 3, p. 236-240, 2011.

PILON, J.; HIGGINS R.; QUESSY S. Epidemiological study of *Yersinia enterocolitica* in swine herds in Quebec. **The Canadian Veterinary Journal**. v. 41, n. 5, p. 383–387. May. 2000.

PIPEK, P. *et al.* Decontamination of pork carcasses by steam and lactic acid. **Journal of Food Engineering**. v. 74, p. 224-231, 2006.

REAGAN, J. O. *et al.* Trimming and washing of beef carcasses as a method of improving the microbiological quality of meat. **Journal of Food Protection**. Ames, v. 59, n. 7, p. 751-756, 1996.

RESTAINO, L. *et al.* Efficacy of ozonated water against various food related microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, DC, v. 61, n. 9, p. 3471–3475, 1995.

RICE, R. G.; GRAHAM, D. M., U.S. FDA **Regulatory Approval of Ozone as an Antimicrobial Agent** – What Is Allowed and What Needs to Be Understood. 2001. Disponível em: <<http://www.ozonia.com/media/pdf/app/FDA-e.pdf>>. Acesso em: 29 out. 2015.

SÃO PAULO. Secretaria de Defesa Agropecuária. Resolução nº 10, de 22 de maio de 2003. Brasília, DF, 2003. Programa Genérico de PROCEDIMENTOS PADRÃO DE HIGIENE OPERACIONAL - PPHO, a ser utilizado nos Estabelecimentos de Leite e Derivados que funcionam sob o regime de Inspeção Federal, como etapa preliminar e essencial dos Programas de Segurança Alimentar do tipo APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle). Disponível em: <<http://www.cda.sp.gov.br/www/legislacoes/popup.php?action=view&idleg=744>> Acesso em: 28 set. 2014.

SCALAN, E. *et al.* Foodborne illness acquired in the United States: major pathogens. **Emerging Infectious Disease**. Atlanta, v. 17, n. 1, p. 7-15, Jan. 2011.

SCHERER, K. *et al.* Time course of Infection with *Salmonella* Typhimurium and its influence on fecal shedding, distribution in inner organs, and antibody response in fattening pigs. **Journal of Food Protection**. Ames, v. 71, p. 699-705, 2008.

SCIENTIFIC opinion of monitoring and identification of human enteropathogenic *Yersinia* spp. Scientific opinion of the panel on biological hazards. **The EFSA Journal**, Parma, v. 595, p.1-30, Dec. 2007. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/de/scdocs/doc/595.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2014

SCIENTIFIC opinion on a quantitative microbiological risk assessment of *Salmonella* in slaughter and breeder pigs. **The EFSA Journal**, Parma, v. 8, n. 4, p. 1-90, Apr. 2010. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/fr/scdocs/doc/1547.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2014.

SCIENTIFIC report of the European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. **The EFSA Journal**, Parma, v. 9, n. 3, p. 1-378. Mar. 2011a. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2090.pdf>>. Acesso em: 25 set. 2014.

SCIENTIFIC opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (swine). **The EFSA Journal**. Parma, v. 9, n. 10, p. 1-198. Oct. 2011b. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2351.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2015.

SCIENTIFIC report of EFSA and ECDC: the European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012, **The EFSA Journal**. Parma, v. 12, n. 2, p. 1-312. Feb. 2014. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3547.pdf>>. Acesso em: 31 jan.2015

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos**. Abr. 2013. Disponível em: <<file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Apresentacao%20da%20Rejane%20Alves%20-%20Coordenadora%20de%20Doencas%20Alimentares.pdf>>. Acesso em: 28 set. 2014.

SHELDON, B.W.; BROWN, A.L. Efficacy of ozone as a disinfectant for poultry carcasses and chilled water. **Journal of Food Science**. Malden, v. 51, n. 2, p. 305–309, 1986.

SKOVGAARD, N.; B. NØRRUNG. The incidence of *Listeria* spp. in faeces of Danish pigs and in minced pork meat. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 8, p. 59–63, 1989.

STIVARIUS, M. R. *et al.* Microbial, instrumental color and sensory color and odor characteristics of ground beef produced from beef trimmings treated with ozone or chlorine dioxide. **Meat Science**. Barking, v. 60, p. 299–305, 2002.

SWANENBURG, M. *et al.* *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 70, p. 243–254, 2001a.

SWANENBURG, M. *et al.* *Salmonella* in slaughter pigs: the effect of logistic slaughter procedures of pigs on the prevalence of *Salmonella* in pork. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 70, p. 231–242, 2001b.

THANOMSUB, B. *et al.* Effects of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria. **Journal of General and Applied Microbiology**. Tokyo, v. 48, n. 4, p. 193-199, 2002.

THÉVENOT, D.; DERNBURG, A.; VERNZOY-ROZAND, C. An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. **Journal of Applied Microbiology**. Oxford, v. 101, p. 7–17, 2006.

TIPA T. N. J. Carne suína: embargo russo causou perdas que superam US\$ 700 milhões no RS: missão virá ao país em julho para avaliar plantas de suínos do estado. **Jornal do Comércio**, Porto Alegre, jun. 2013: Disponível em: <<http://jcrs.uol.com.br/site/noticia.php?codn=126567>>. Acesso em: 21 jan. 2015.

TIWARI, B. K. *et al.* Application of ozone in grain processing. **Journal of Cereal Science**. v. 51, p. 248–255, 2010.

TORLAK, E.; SERT, D.; ULCA, P. Efficacy of gaseous ozone against *Salmonella* and microbial population on dried oregano. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 165, p. 276–280, 2013.

TRINDADE, M. A. Comparison of ozone and chlorine in low concentrations as sanitizing agents of chicken carcasses in the water immersion chiller. **Journal of Food Protection**. Ames, v. 75, n. 6, p. 1139–1143, 2012.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Generic HACCP model for pork slaughter**, Washington, DC, 1999. Disponível em:

<<http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/e682d684-e8e3-4279-be2d-5753e2bce453/HACCP-14.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 15 set. 2014.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Hawaii Firm Recalls Ready-To-Eat Pork Product for Possible *Listeria* Contamination. Set. 2013. Disponível em:

<http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/recalls-and-public-health-alerts/current-recalls-and-alerts/current-recalls-and-alerts!/ut/p/a1/jZDBC0JAEIafpQdYdkwRPcqCqeUuEpntJRYzW9hWWa1DT5_Sychq5jTM9_MxgzkuMnfiLmvRy0YLNc7cPUIGruUTSFgYhBBTO8w9urKAuQNwmAC-NQJ5xtaEgEftP_MzFcCvfPKHYGIsktaYt6K_IKnPDS7KmzGV7pGpSqFUh4Q-IaEq03dfd3vMpz6whh58WydKqA3MeQc-POQFzF_cXnFYxOBjIPFE8yNdkQ!/?1dmy¤t=true&urile=wcm%3apath%3a%2Ffsis-archives-content%2Finternet%2Fmain%2Ftopics%2Frecalls-and-public-health-alerts%2Frecall-case-archive%2Farchives%2Fct_index572>. Acesso em: 26 de setembro de 2014.

UNITED STATES OF AMERICA. United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service. Rules and Regulations 9 CFR, Part 304. Pathogen Reduction: Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Systems / Specific Sample Collection Procedure, Federal Register, Washington, DC, v. 61, n. 144, Jul. 1996. Disponível em: <<http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/93-016F.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2014.

VAN DAMME, I.; HABIB, I.; DE ZEUTTER, L. *Yersinia enterocolitica* in slaughter pig tonsils: enumeration and detection by enrichment versus direct plating culture. **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 1, p. 158–161, 2010.

VENTANAS, S. *et al.* Protein and lipid oxidation in Longissimus dorsi and dry cured loin from Iberian pigs as affected by crossbreeding and diet. **Meat Science**. Barking, v. 72, p. 647–655, 2006.

WHEATLEY, P.; GIOTIS, E. S.; MCKEVITT, A. I. Effects of slaughtering operations on carcass contamination in an Irish pork production plant. **Irish Veterinary Journal**, v. 67, n. 1, p. 1-6, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, *Salmonella* (non-typhoidal): key facts. Geneva, Aug. 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>>. Acesso em: 31 de jan. 2015.

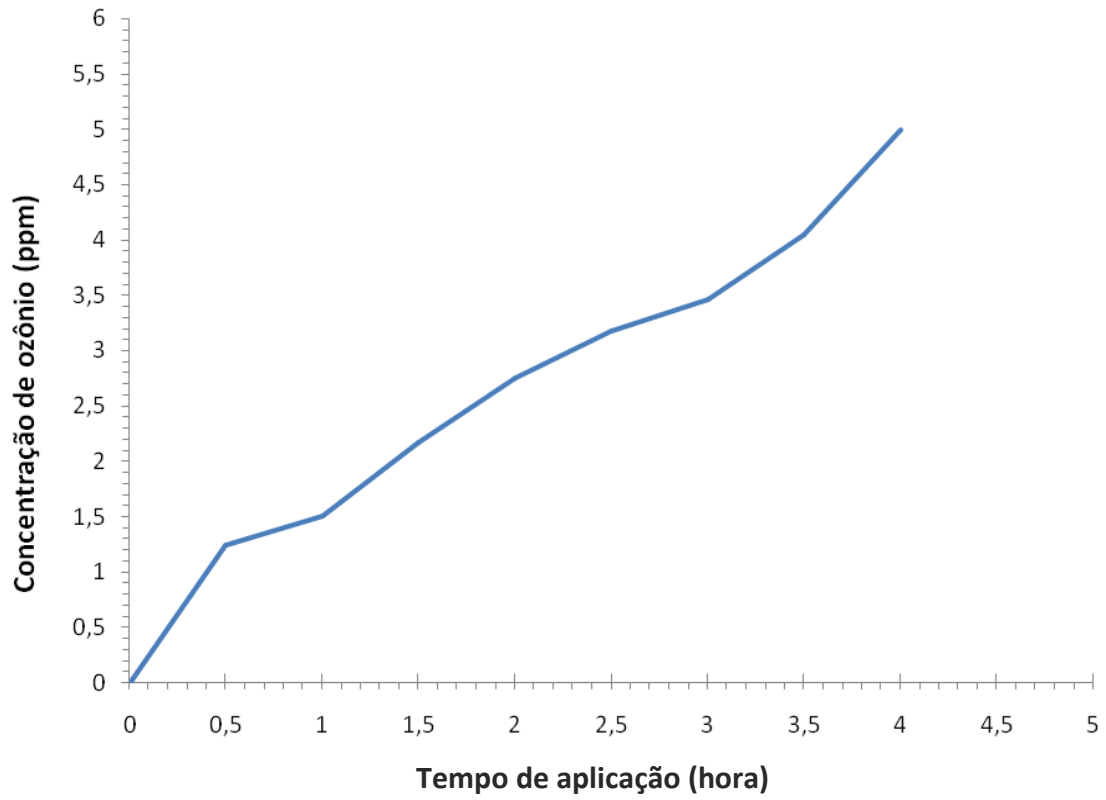
XAVIER, L.H. Modelos univariado e multivariado para análise de medidas repetidas e verificação da acurácia do modelo univariado por meio de simulação. Piracicaba, 91 p. Dissertação (mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2000.

YU, S. L. *et al.* Effect of dehairing operations on microbiological quality of swine carcasses. **Journal of Food Protection**. Ames, v. 62, n. 12, p. 1478-1481, 1999.

ZEYNEP G. S.; BEVER P. I. J.; GREENE , A. K. Efficacy of ozone to reduce bacterial populations in the presence of food components. **Food Microbiology**. London, v. 21, p. 475–479, 2004.

ZEYNEP, B. G.; GREENE A. K; SEYDIM, A. C. Use of ozone in the food industry, **Lebensm. Wiss. u. Technol.** v. 37, p. 453–460, 2004.

Apêndice A – Gráfico demonstrando a concentração de ozônio (ppm) aplicada na câmara fria do matadouro-frigorífico em função do tempo de aplicação (hora).



Apêndice B- Relação dos valores médios, mínimos e máximos encontrados nas contagens de mesófilos aeróbios totais (T1 e T2) e o número de carcaças positivas para *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. e *Listeria* sp. (T1 e T2) nas carcaças amostradas antes e depois de 16 horas de resfriamento.

Bloco	Período	Contagem em log UFC/cm ²			Número de carcaças positivas		
		Mesófilos aeróbios totais			<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Listeria</i> sp.
		Média	Mínimo	Máximo			
1 (n=16)	Antes do resfriamento	2,81	1,39	3,66	ND	1	2
	Depois do resfriamento	2,55	1,25	3,66	ND	0	0
2 (n=16)	Antes do resfriamento	2,76	2,1	3,14	12	2	0
	Depois do resfriamento	2,66	1,75	3,19	7	4	0
3 (n=16)	Antes do resfriamento	2,83	1,65	3,57	10	1	6
	Depois do resfriamento	2,51	2,1	2,85	8	1	3
4 (n=16)	Antes do resfriamento	2,36	1,57	2,74	3	4	0
	Depois do resfriamento	2,5	1,47	3,02	7	5	2
5 (n=15)	Antes do resfriamento	2,49	1,76	2,96	4	1	1
	Depois do resfriamento	1,97	1,24	2,28	5	1	1

ND: Não determinado